



**You have downloaded a document from
RE-BUS
repository of the University of Silesia in Katowice**

Title: Zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej z detekcją densytometryczną oraz innych instrumentalnych technik analitycznych do badania reakcji oscylacyjnych wybranych aminokwasów i hydroksykwasów pochodnych kwasu propionowego i kwasu masłowego

Author: Dorota Kronenbach

Citation style: Kronenbach Dorota. (2012). Zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej z detekcją densytometryczną oraz innych instrumentalnych technik analitycznych do badania reakcji oscylacyjnych wybranych aminokwasów i hydroksykwasów pochodnych kwasu propionowego i kwasu masłowego. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIwersYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

Dorota Kronenbach

**Zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej z detekcją
densytometryczną oraz innych instrumentalnych technik
analitycznych do badania reakcji oscylacyjnych wybranych
aminokwasów i hydroksykwasów pochodnych kwasu
propionowego i kwasu masłowego**

Opiekun pracy

Prof. dr. hab Teresa Kowalska

Opiekun pomocniczy pracy

Dr Mieczysław Sajewicz

Zakład Chemii Ogólnej i Chromatografii

Instytut Chemii

Uniwersytet Śląski

w Katowicach

**Instytut Chemii
Uniwersytet Śląski
Katowice, 2012**

Składam serdeczne podziękowania:

Pani Profesor dr hab. Teresie Kowalskiej za inspirację, za kilkuletnie kierowanie moim rozwojem naukowym, a w szczególności za cierpliwość, wyrozumiałość, pomoc i cenne wskazówki podczas realizacji tej rozprawy

Panu Doktorowi Mieczysławowi Sajewiczowi za bezinteresowny wkład włożony w realizację badań

Europejskiemu Funduszowi Społecznemu za wsparcie finansowe w postaci stypendium projektu "Uniwersytet Partnerem Gospodarkę Opartą na Wiedzy" przyznawanego mi w latach 2008-2011

Dedykacja:

Tym, którzy byli światłem potrzebnym dla osiągnięcia mojego celu.

*Mojemu Aniołkowi,
mojej najdroższej Mamie.*

*mojemu Tacie,
mojej Siostrze,*

oraz

mojemu kochanemu Krzysiu.

	str.
1. Wstęp	7
2. Inwersja chiralna aminokwasów i jej wybrane przejawy w środowisku naturalnym	9
2.1. Teorie dotyczące prebiotycznego i biotycznego pochodzenia aminokwasów	9
2.2. Datowanie organicznych znalezisk archeologicznych	13
2.2.1. Racemizacja wolnych aminokwasów	17
2.2.1.1. Struktura cząsteczkowa	17
2.2.1.2. Odczyn roztworu	18
2.2.1.3. Temperatura	18
2.2.2. Racemizacja związanych aminokwasów - wpływ czynników na szybkość reakcji	20
2.2.2.1. Struktura cząsteczkowa	20
2.2.2.2. Odczyn roztworu	20
2.2.2.3. Temperatura	21
2.2.2.4. Chromatografia gazowa w datowaniu znalezisk archeologicznych	22
2.3. Badanie znalezisk pochodzenia pozaziemskiego	23
3. Hydroksykwasy karboksylowe i ich znaczenie biologiczne	27
3.1. Skóra i jej znaczenie	27
3.1.1. Budowa skóry	27
3.1.2. Funkcje skóry	29
3.2. Historia hydroksykwasów	30
3.2.1. Podział hydroksykwasów	30
3.2.1.1. α – Hydroksykwasy (AHA)	30
3.2.1.2. β –Hydroksykwasy (BHA)	31
3.2.2. Wybrane hydroksykwasy o istotnym znaczeniu biologicznym	32
3.2.2.1. Kwas cytrynowy	32
3.2.2.2. Kwas glikolowy	33
3.2.2.3. Kwas jabłkowy	35
3.2.2.4. Kwas salicylowy	37
3.2.2.5. Kwas winowy	38
3.2.2.6. Kwas mlekowy	39
4. Chemiczne procesy nieliniowe	44

4.1. Reakcja Bielousowa–Żabotyńskiego (reakcja B–Ż)	45
4.2. Bijące „serce” rtęciowe	48
4.3. Brukselator	50
5. Cel pracy	52
6. Część doświadczalna	53
6.1. Odczynniki i materiały	53
6.2. Sprzęt i aparatura	56
6.3. Metodyka badań	58
6.3.1. Technika chromatografii cienkowarstwowej (TLC)	58
6.3.2. Technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją DAD i -ELSD	61
6.3.3. Technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej ze spektrometrią masową (HPLC-MS)	62
6.3.4. Technika spektroskopii ^{13}C NMR	62
6.3.5. Pomiary polarymetryczne	63
7. Wyniki badań i ich omówienie	65
7.1. Oscylacyjne zmiany wartości współczynnika retardacji (R_F) oraz skręcalności właściwej <i>L</i> -tyrozyny	65
7.1.1. Chiralna chromatografia cienkowarstwowa	65
7.1.2. Polarymetria	71
7.2. Oscylacyjne zmiany wartości współczynnika retardacji (R_F) oraz skręcalności właściwej <i>L</i> -alaniny	76
7.2.1. Chiralna chromatografia cienkowarstwowa	76
7.2.2. Polarymetria	81
7.3. Oscylacyjne zmiany wartości współczynnika retardacji (R_F) oraz skręcalności właściwej ($[\alpha]_D$) <i>L</i> - α -fenyloalaniny	85
7.3.1. Chiralna chromatografia cienkowarstwowa	85
7.3.2. Polarymetria	90
7.4. Kwas mlekowy	95
7.4.1. Oscylacyjne zmiany wartości współczynnika retardacji (R_F) oraz skręcalności właściwej ($[\alpha]_D$) kwasu <i>L</i> -mlekowego	95
7.4.1.1. Chiralna chromatografia cienkowarstwowa	95
7.4.1.2. Polarymetria	102
7.4.2. Badanie polikondensacji kwasu mlekowego	108
7.4.2.1. Achiralna wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją DAD i ELSD	108

7.4.2.2. Achiralna wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją MS	119
7.4.2.3. Spektroskopia węglowego magnetycznego rezonansu jądrowego (^{13}C NMR)	122
7.4.3. Modelowanie procesów oscylacyjnej inwersji chiralnej i oscylacyjnej kondensacji kwasu <i>L</i> -mlekowego	123
7.5. Oscylacyjne zmiany wartości współczynnika retardacji (R_F) oraz skręcalności właściwej ($[\alpha]_D$) kwasu <i>S</i> - α -hydroksymasłowego i <i>R</i> - α -hydroksymasłowego	126
7.5.1. Chiralna chromatografia cienkowarstwowa	126
7.5.2. Polarymetria	131
7.5.2.1. Polarymetria kwasu <i>S</i> - α -hydroksymasłowego	131
7.5.2.2. Polarymetria kwasu <i>R</i> - α -hydroksymasłowego	134
7.6. Oscylacyjne zmiany wartości współczynnika retardacji (R_F) oraz skręcalności właściwej ($[\alpha]_D$) kwasu <i>R</i> - β -hydroksymasłowego	137
7.6.1. Chiralna chromatografia cienkowarstwowa	137
7.6.2. Polarymetria kwasu <i>R</i> - β -hydroksymasłowego.	141
8. Wnioski	143
9. Streszczenie	144
10. Literatura	146
11. Życiorys	153
12. Lista prac własnych tematycznie związana z rozprawą doktorską	154
13. Lista publikacji konferencyjnych tematycznie związana z rozprawą doktorską	156

1. Wstęp

Wcześniejsze badania nad zachowaniem chiralnych pochodnych kwasu propionowego (w tym m.in. dwóch arylowych pochodnych tego kwasu, tj. *S*-(+)-ibuprofenu i *S*-(+)-naproksenu), należących do grupy leków profenowych i rozpuszczonych w rozpuszczalnikach wodnych oraz w rozpuszczalniku niewodnym po raz pierwszy wykazały, iż związki te w warunkach abiotycznych mogą *in vitro* ulegać samorzutnej, oscylacyjnej konwersji chiralnej, w ten sposób przekształcając się we własne antymery. Badania te zostały przeprowadzone w zespole badawczym, kierowanym przez prof. Teresę Kowalską, demonstrując istotną i wcześniej nie stwierdzoną labilność steryczną w warunkach pozaustrojowych wybranych, chiralnych pochodnych kwasu propionowego.

Wstępne wyniki dotyczące wykazanej labilności sterycznej kilku wybranych pochodnych kwasu propionowego z grupy profenów oraz oscylacyjnego charakteru obserwowanych konwersji skłoniły nas do refleksji w odniesieniu do prawdopodobnej powszechności tego zjawiska, zwłaszcza w kontekście oczywistego faktu, iż niskocząsteczkowe chiralne kwasy karboksylowe odgrywają istotną rolę w rozmaitych naturalnie przebiegających procesach biochemicznych.

Pytania odnośnie do sterycznej labilności chiralnych kwasów karboksylowych mogą być różnorakie i liczne. Miedzy innymi mogą one dotyczyć wpływu rodzaju podstawników przy centrum asymetrii, wpływu odległości między grupą karboksylową a tymże centrum, czy wreszcie wpływu długości szkieletu węglowego danego kwasu karboksylowego na występowanie bądź nie występowanie samorzutnej, oscylacyjnej konwersji chiralnej rozpatrywanych związków.

Zamierzeniem niniejszej pracy doktorskiej jest znalezienie przynajmniej częściowej odpowiedzi na wyżej sformułowane pytania, w tym celu zaplanowano więc określone doświadczenia oraz dobrano odpowiednie do tych planów techniki analityczne.

Podstawową techniką analityczną, umożliwiającą stosunkowo prosty i jednocześnie bezpośredni wgląd w przebieg procesu konwersji chiralnej jest chromatografia cienkowarstwowa z detekcją densytometryczną, umożliwiającą nie tylko rozdział enancjomeryczny mieszanin skalemicznych i racemicznych, ale także dalsze badanie rozdzielonych antymerów. Pod tym względem chromatografia cienkowarstwowa posiada sprawność porównywalną ze sprawnością innych, bardziej zinstrumentalizowanych i generalnie uważanych za sprawniejsze technik chromatograficznych, a pod pewnymi względami nawet je przewyższa.

Drugą podstawową techniką analityczną, stosowaną do badania związków chiralnych oraz ich przemian jest polarymetria. Obie te techniki – chiralna chromatografia cienkowarstwowa i polarymetria – zostały szeroko wykorzystane w przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej badaniach.

Innymi technikami instrumentalnymi, które umożliwiły pogłębiony wgląd eksperymentalny w proces oscylacyjnej konwersji chiralnej były m.in. wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), spektroskopia ^{13}C NMR oraz spektrometria mas.

2. Inwersja chiralna aminokwasów i jej wybrane przejawy w środowisku naturalnym.

2.1. Teorie dotyczące prebiotycznego i biotycznego pochodzenia aminokwasów.

„Na początku było Słowo, a Słowo było u Boga, i Bogiem było Słowo.”

Biblia (J 1:1-3)

Początki życia na Ziemi to myśl, która nurtuje nas od zarania dziejów. Można pokusić się o stwierdzenie, że jest ona tak stara, jak ludzkość. Najstarsze mity i wierzenia religijne traktują o stworzeniu świata, o początkach życia i o początkach ludzkości. Dla większości z tych mitów charakterystyczny jest fakt, iż człowiek i wszystkie istoty żywe zostały stworzone z ziemi, kamienia i gliny, czyli z substancji nieorganicznych, za sprawą sił nadprzyrodzonych – bóstw. Bóstwo, istota podobna do człowieka, ale znacznie potężniejsza od niego, kierowała siłami natury, a akt stworzenia wszystkiego, co żywe miał wymiar cudu. W taki oto sposób pierwotne mity i wierzenia religijne o nadprzyrodzonym powstaniu Ziemi i życia na niej, ukształtowały obraz jednego Boga – Stwórcy. Bóg jako istota rozumna celowo zbudował wszechświat, stworzył Ziemię, wszystko co na niej żywe i powołał do życia człowieka jako pana Ziemi. Ta idea przetrwała do dnia dzisiejszego jako centralny punkt wierzeń religijnych.

Historia zmagania z kreacjonistycznym ujęciem pochodzenia życia i próby materialistycznego wytłumaczenia tego zjawiska zrodziły się w VI wieku p.n.e. w starożytnej Grecji. Pierwsze poglądy na ten temat głosił Tales z Miletu. Na początku była woda, z niej powstał ląd, na którym pod wpływem ciepła z mułu i substancji nieorganicznych powstały zarodki najprymitywniejszych żywych istot, które dały początki światu organicznemu.

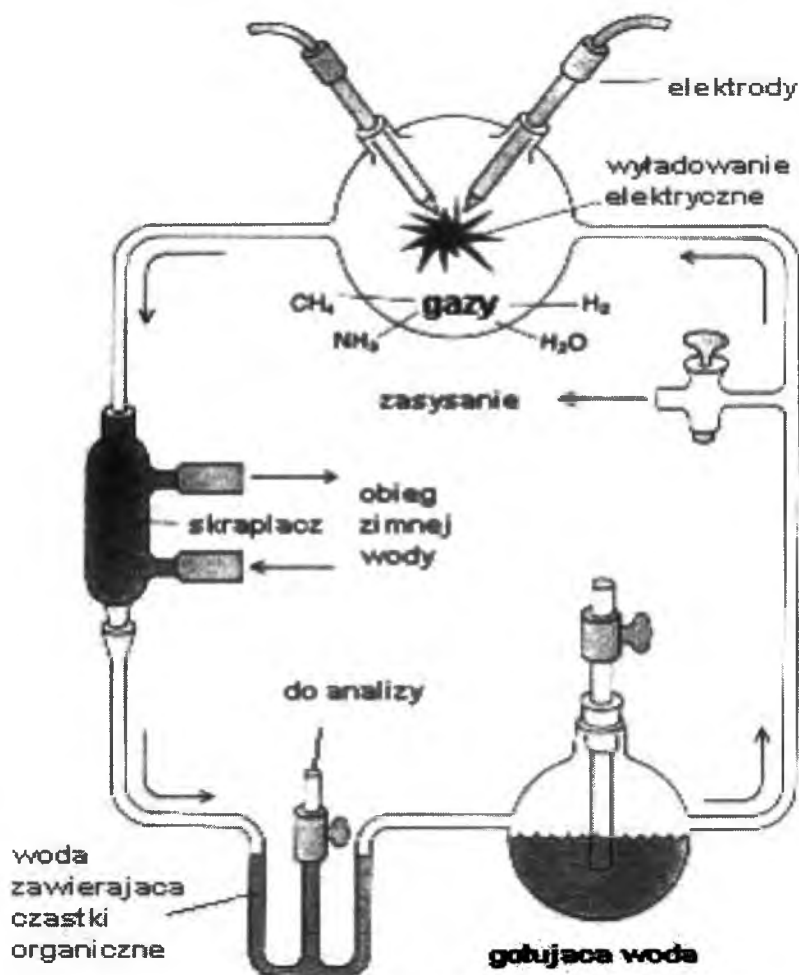
Darwin przyjął, iż życie powstało w „ciepłej kałuży” [1]. Jego koncepcja ewolucjonizmu zakłada możliwość chemicznego pochodzenia życia [2], jednak źródło życia nazywał Stwórcą [3]. Mimo to był przekonany, iż przyszłe badania naukowe dostarczą wiedzy, która będzie wskazywać na czysto przyrodnicze pochodzenie życia biologicznego. I tak do czasu badań prowadzonych przez Pasteura w drugiej połowie XIX wieku, z których wynikało,

iż samoródtwo bakterii jest niemożliwe, bardzo wielu uczonych i badaczy wierzyło, że życie może powstać samorzutnie z materii nieożywionej. Na początku XX wieku uznawano teorię panspermii, sformułowaną przez Arrheniusa, chemika i laureata nagrody Nobla. Jej

kluczowym założeniem jest kosmiczna geneza życia na Ziemi. Meteoryty spadając na Ziemię przenosiły z najodleglejszych zakątków wszechświata formy przetrwalnikowe, które umożliwiły przetrwanie bakterii, a następnie rozwinięcie się bardziej złożonych form życia na Ziemi.

Teoria powstania aminokwasów na drodze chemicznej z cząsteczek nieorganicznych pojawiła się po raz pierwszy w 1923 roku i została ogłoszona jako teoria Haldane'a – Oparina [4]. Rosyjski biochemik Oparin [5] i angielski biochemik Haldane [6] zaproponowali teorię, według której pierwsze żywe komórki powstały na drodze chemicznej ewolucji, która rozpoczęła się wraz z pojawieniem się prostych gazów w pierwotnej atmosferze Ziemi. Atmosfera składała się z takich gazów, jak metan (CH_4), etan (C_2H_6), amoniak (NH_3), para wodna (H_2O), siarkowodór (H_2S) i wodór cząsteczkowy (H_2). Zakładano, że tlen cząsteczkowy (O_2) był na tym etapie nieobecny. Oparin uważał, że takie źródła energii, jak promieniowanie ultrafioletowe emitowane przez Słońce, energia elektryczna z naturalnych wyładowań elektrycznych, naturalna promieniotwórczość oraz ciepło spowodowały, że gazy reagowały ze sobą, tworząc bardziej złożone substancje, jak np. aminokwasy (podstawowy składnik białek budujący nasze tkanki), puryny, pirymidyny (zasady azotowe wchodzące w skład łańcuchów RNA i DNA — najważniejszych nośników informacji w świecie ożywionym) i cukry. Wszystkie te substancje formowały się w pierwotnych oceanach tworząc „zupę organiczną”, czyli „prabulion” [7]. Biomonomery łącząc się tworzyły przypuszczalnie pierwsze białka, kwasy nukleinowe i inne cząsteczki. Następnie cząstki te tworzyły łańcuchy polimerów, a te z kolei mikroskopijne „protokomórki” [8,9]. Proces ten prawdopodobnie zachodził w płytkich stawach, a „protokomórki” przypuszczalnie rozpoczęły rywalizację między sobą, co przyczyniło się do uformowania pierwszych żywych komórek [5]. Wyrażono przypuszczenie, iż proces ten zajął setki milionów lat.

Teoria Haldane'a – Oparina została poddana próbie doświadczalnej przez amerykańskiego badacza Millera [10] w 1953 roku.



Rys.1. Schemat aparatury wykorzystanej w eksperymencie Millera [11]

Miller zbudował z kilku szklanych rurek i kolb prądowy świat (rys.1.). Kolba z podgrzewaną wodą stanowiła „ocean”, który parując w obiegu zamkniętym tworzył swoistą „atmosferę”. Układ ten zawierał takie gazy, jak metan, amoniak i wodór, które zostały umieszczone w górnej kolbie z wtopionymi elektrodami. Do elektrod doprowadzono prąd elektryczny pod wysokim napięciem, którego wyładowania symulowały wyładowania atmosferyczne, jakie panowały w prądowym świetle. Ich głównym zadaniem było umożliwienie zajścia reakcji między składnikami znajdującymi się w szklanej kuli. Zaowocowało to powstaniem nowych związków chemicznych. Odpływ z tej kolby prowadził przez kolejną szklaną rurkę dochodzącą z powrotem do pierwszej kolby przez skraplacz i zbiornik otrzymanych produktów reakcji. Miller rozpoczął podgrzewanie kolby stanowiącej „ocean”. Podgrzana mieszanina zaczęła parować i wędrowała do kolby, w której wywoływano wyładowania elektryczne. W ten oto sposób próbowano odwzorować naturalne warunki, jakie prawdopodobnie panowały w atmosferze globu ziemskiego przed kilkoma miliardami lat. Związki były w sposób ciągły gromadzone w naczyniu zwanym wodną

pułapką, która umożliwia pobieranie próbek do badania. Po tygodniu prowadzenia tego eksperymentu Miller pobrał próbkę i poddał ją szczegółowej analizie. Rezultaty tej pracy wynagrodziły jego wysiłek. Badanie wykazało, że podczas eksperymentu doszło do samorzutnej syntezy wielu aminokwasów, które są podstawowym budulcem białek wchodzących w skład wszystkich organizmów żywych. W wyniku tego eksperymentu otrzymano trzynaście aminokwasów z dwudziestu podstawowych, budujących białka w żywych organizmach oraz puryny i pirymidyny wchodzące w skład RNA i DNA.

Eksperyment ten zdaje się nas przekonywać o możliwości powstania życia właśnie w taki sposób. Proces tworzenia DNA, a następnie białka, które rozwinęło by się i było zdolne funkcjonować oraz rozmnażać się dając formy życia, mógł kiedyś zaistnieć. Jednak prawdopodobieństwo powstania owego białka i przypadkowego połączenia się związków chemicznych w „prabulionie” jest stosunkowo małe.

Kolejny problem wynika z faktu, iż substancje, które powstały w eksperymencie Millera były chronione w szklanej kuli, co nie jest dokładnym odwzorowaniem przyrody, w której zachodził rzeczywisty proces.

Przeprowadzone doświadczenie nie daje nam również odpowiedzi na pytanie, dlaczego materia ożywiona woli lewoskrętne enancjomery aminokwasów od prawoskrętnych. Produkty, jakie otrzymano w eksperymencie Millera, były racemiczne, czyli były równomolową mieszaniną enancjomerów *L* i *D* [12,13].

Kolejna luka, jaką możemy zauważyć w teorii Oparina polega na tym, iż posiadamy dowody na istnienie całkiem sporych ilości tlenu w pierwotnej atmosferze Ziemi. Świadczy o tym pochodząca z analizy najstarszych skał [14], a ponadto nie mamy żadnych dowodów na istnienie „prabulionu” [15,16].

Zastanawiający jest również kolejny problem. Wyładowania elektryczne, jakie zachodziły w pierwotnej atmosferze Ziemi, symulowały reakcję pomiędzy składnikami, co z kolei prowadziło do powstania nowych związków chemicznych. Jednak te same źródła energii, które doprowadziły do powstania związków chemicznych, mogły przecież powodować również ich niszczenie [17,18]. Powstające w doświadczeniu Millera substancje były chronione i nie poddawano ich dokładnie takim samym warunkom, jakie panowały u zarania dziejów.

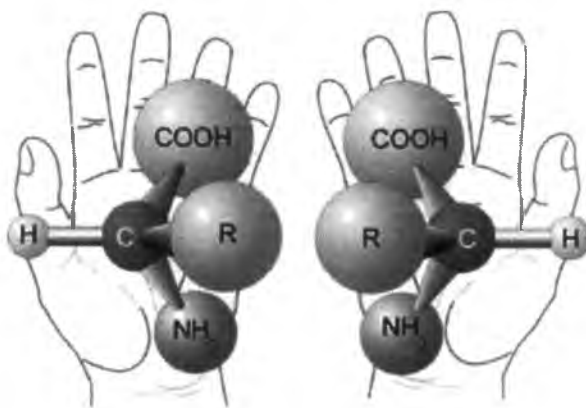
W obecnych czasach istnieje wiele teorii próbujących rozwiązać ten jakże złożony problem. To, co wydaje się prawie pewne to fakt, iż życie powstało ok. 4 miliardów lat temu w warunkach beztlenowych, a jego powstanie doprowadziło do nieodwracalnych zmian warunków, jakie panowały na Ziemi. Gdyby udało się odkryć mechanizm sprawiający, że

aminokwasy, takie jak te otrzymane w eksperymencie Millera, będą się łączyć tworząc białka bez replikacyjnej dyrektywy DNA, to być może zbliżymy się do odkrycia początków życia na Ziemi.

2.2. Datowanie organicznych znalezisk archeologicznych

Racemizacja aminokwasów jest używana do oznaczania wieku próbek pochodzenia biologicznego, takich, jak kości, muszle, czy zęby. Na racemizacji opiera się niezależna technika datowania materiału biologicznego, użyteczna przy uściśleniu informacji chronometrycznych, uzyskanych innymi metodami. Co więcej, metoda ta wydaje się przydatna do pozyskiwania informacji o temperaturowej historii środowiska, w którym przebywała dana próbka.

Aminokwasy to związki budujące białka i większość z nich może występować w postaci dwóch form, lewoskrętnej (*L*) i prawoskrętnej (*D*), które nazywamy enancjomerami.



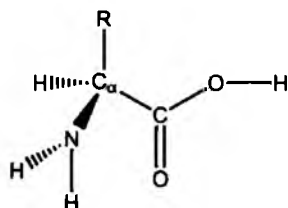
Rys.2. Graficzne przedstawienie dwóch enancjomerycznych aminokwasów [19]

W wyżej zorganizowanych organizmach żywych aminokwasy występują prawie wyłącznie w konfiguracji *L*, a stosunek enancjomeru *L* do jego antymeru wskazuje na zdecydowaną dominację formy *L*. Po śmierci, białka ulegają rozkładowi i enancjomery *L* aminokwasów zmieniają swoją konfigurację na przeciwną. Wraz z upływem czasu stosunek ilościowy formy *D* do *L* zmierza do jedności. Proces ten nazywamy racemizacją. Jeżeli wzajemny stosunek ilościowy enancjomerów jest różny od jedności, wówczas istnieje możliwość oszacowania wieku próbek pochodzenia biologicznego. Ponad pięćdziesiąt lat

temu Abelson [20] wyodrębnił aminokwasy z muszli, a następnie zasugerował, aby wykorzystać kinetykę reakcji inwersji chiralnej aminokwasów jako podstawę datowania szczątków archeologicznych [21]. Racemizacja jest reakcją chemiczną, na której szybkość wywiera wpływ wiele czynników. Do czynników tych zaliczamy przede wszystkim [22]:

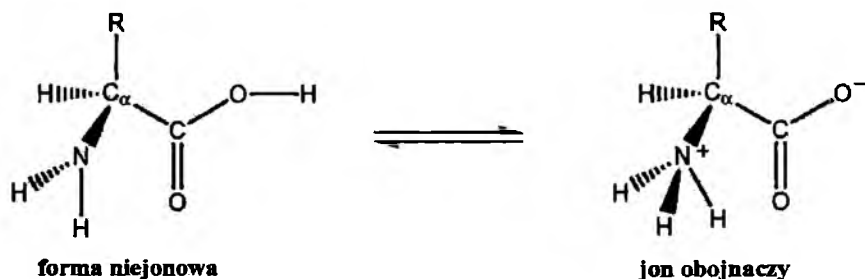
- ❖ strukturę molekuly,
- ❖ odczyn roztworu,
- ❖ stężenie buforu oraz
- ❖ temperaturę.

Istnieje około dwudziestu podstawowych aminokwasów, wchodzących w skład większości białek. Aminokwasy zawierają asymetryczny atom węgla w położeniu α , C_α . Taki atom węgla jest otoczony przez cztery różne podstawniki i stanowi centrum chiralności związku. Spośród tych podstawowych aminokwasów tylko glicyna nie posiada centrum chiralności.



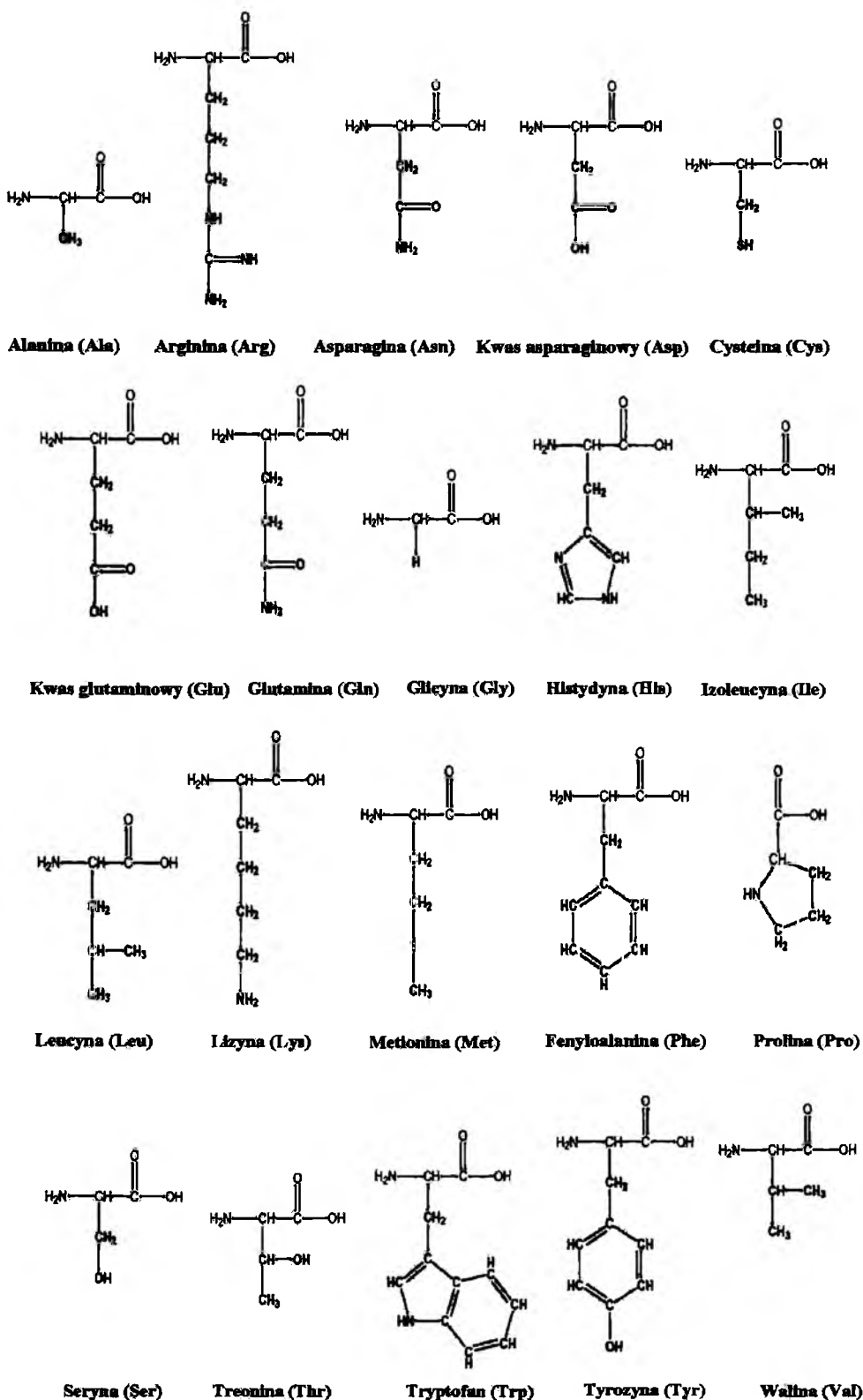
Rys.3. Uogólniona struktura aminokwasów

Forma aminokwasu zależy od odczynu środowiska, który w komórkach organizmów żywych jest bliski obojętnemu. W takim środowisku aminokwas może istnieć w postaci jonu obojnaczego. Jony obojnacze stanowią dominującą postać aminokwasu przy charakterystycznej dla każdego aminokwasu wartości pH, zwanej punktem izoelektrycznym (pI). Dla dwudziestu podstawowych aminokwasów wartość punktu izoelektrycznego zawiera się w przedziale od 2,77 (kwas asparaginowy) do 10,76 (arginina).



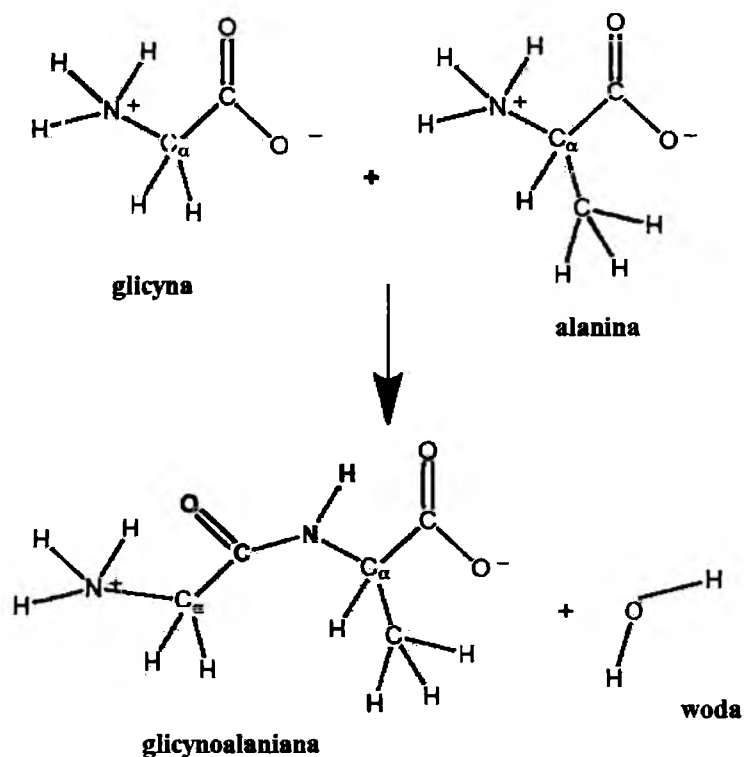
Rys.4. Proces powstawania jonu obojnaczego aminokwasów

Struktury cząsteczek wszystkich α -aminokwasów są bardzo do siebie zbliżone. Molekuły różnią się od siebie jedynie jednym podstawnikiem R, związanym z asymetrycznym atomem węgla.



Rys.5. Struktura dwudziestu podstawowych aminokwasów wchodzących w skład białek [23]

W trakcie reakcji peptyzacji dwie łączące się ze sobą cząsteczki tworząc wiązanie peptydowe uwalniają cząsteczkę wody. Cząsteczkę utworzoną przez połączenie dwóch molekuł nazywamy dipeptydem. Trzy cząsteczki aminokwasu tworzą tripeptyd, natomiast łańcuch zbudowany z większej liczby pojedynczych aminokwasów nazywamy polipeptydem. Wiązanie peptydowe tworzy się przy udziale grupy aminowej jednej cząsteczki aminokwasu i grupy karboksylowej drugiej cząsteczki. Przykład powstawania wiązania peptydowego przedstawiono na poniższym rysunku.



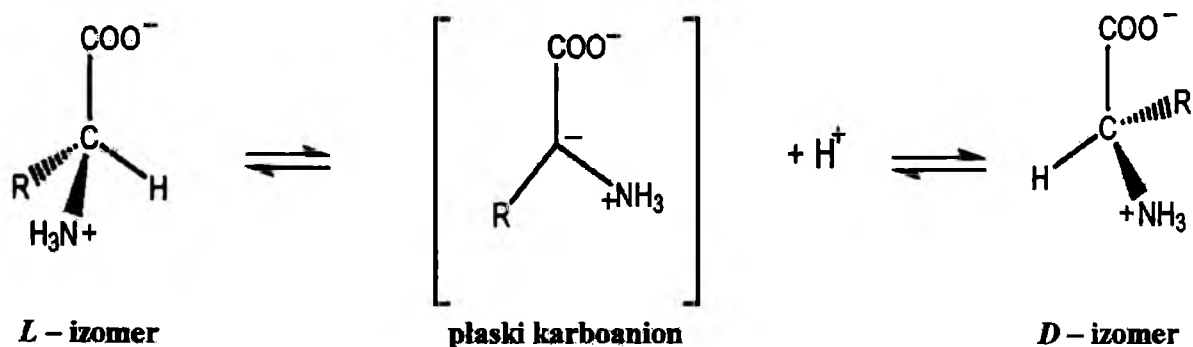
Rys.6. Przykład powstawania mieszanego dipeptydu glicynoalaniny z aminokwasów glicyny i alaniny [23]

Aminokwasy występują głównie w białkach żywych lub martwych organizmów, przy czym białka jako budulec tkanek stanowią co najmniej połowę suchej masy żywych komórek [24]. Peptydy są obecne zarówno w tkankach miękkich, jak i w tkance kostnej. Nie wszystkie jednak aminokwasy występujące w komórkach są elementami budulcowymi białek. Wolne aminokwasy mogą odgrywać ważną rolę w procesach biochemicznych, do których zaliczamy reakcje syntezy i przemiany materii oraz neuroprzekaznictwo [25].

2.2.1. Racemizacja wolnych aminokwasów

Jak wcześniej wspomniano, na szybkość reakcji racemizacji wpływają takie czynniki, jak budowa chemiczna aminokwasów, ich sekwencja w białkach, pH środowiska, obecność kationów metali czy wody oraz temperatura.

Zgodnie z ogólnie przyjętym mechanizmem, racemizacja aminokwasów w roztworach wodnych przebiega z powstaniem płaskiego karboanionu jako formy przejściowej [26]. Powstanie karboanionu jest poprzedzone oderwaniem atomu wodoru przyłączonego do atomu α węgla przez zasadę (grupę OH^-), czy cząsteczkę wody. W ten sposób powstaje płaski karboanion obdarzony ładunkiem ujemnym. Ostatnim etapem reakcji racemizacji jest ponowne przyłączenie jonu wodorowego do karboanionu. W wyniku takiego przyłączenia może powstać zarówno enancjomer prawoskrętny (*D*), jak i lewoskrętny (*L*). Prawdopodobieństwo powstania każdego z tych enancjomerów wynosi pięćdziesiąt procent (rys.7.). Taki właśnie mechanizm reakcji racemizacji aminokwasów potwierdzają między innymi szczegółowe badania przeprowadzone na *L*-izoleucynie [27].



Rys.7. Ogólny mechanizm reakcji racemizacji aminokwasów [23]

2.2.1.1. Struktura cząsteczkowa

Grupy związane z atomem α węgla występującego w wolnych aminokwasach wpływają na szybkość reakcji racemizacji. Wśród nich możemy wyróżnić takie grupy, które stabilizując ładunek karboanionu przyspieszają proces racemizacji. Analogicznie grupy destabilizujące ładunek karboanionu opóźniają proces przemiany konfiguracji przestrzennej aminokwasu [28]. Grupa $-\text{COO}^-$, obecna w jonie obojnaczym, wpływa destabilizująco na formę przejściową, z uwagi na bliskie sąsiedztwo dwóch ładunków ujemnych (rys.7). Z kolei

grupa $-\text{NH}_3^+$ stabilizuje karboanion dzięki obecności ładunku przeciwnego do ładunku karboanionu. Skoro wszystkie aminokwasy posiadają zarówno grupę aminową, jak i karboksylową, podstawowych różnic w charakterystyce fizykochemicznej związków należy dopatrywać się w strukturze chemicznej ugrupowania $-\text{R}$ oraz w indukcyjnym efekcie elektronowym wywieranym przez ten podstawnik na całą cząsteczkę [29,30,31]. Poniżej przedstawiono aminokwasy uszeregowane według malejącej szybkości ich racemizacji [32].



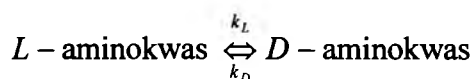
2.2.1.2. Odczyn roztworu

Bada i współpracownicy [29,30,33,] analizowali zależność reakcji racemizacji ośmiu aminokwasów od odczynu roztworu. Badania te zostały przeprowadzone w pokojowej i podwyższonej temperaturze (142°C) dla szeregu różnych roztworów wodnych. W przypadku aminokwasów monokarboksylowych kinetyka reakcji racemizacji okazała się praktycznie niezależna od odczynu roztworu dla pH z przedziału 3-9, co pokrywa się z odczynem środowiska naturalnego. Innymi słowy można z pewną dozą uproszczenia stwierdzić, że reakcja racemizacji w przyrodzie nie jest zbyt zależna od wartości pH.

2.2.1.3. Temperatura

Wpływ temperatury na szybkość reakcji racemizacji jest następujący: wraz ze wzrostem temperatury szybkość tej reakcji wzrasta [34]. Stałe szybkości reakcji racemizacji zależą od temperatury i można je wyznaczyć eksperymentalnie. Pomiar odpowiednich stałych szybkości przeprowadza się w stałej temperaturze, a zmiany stężenia reagentów mierzy się w funkcji czasu [34].

Wolne aminokwasy ulegają odwracalnej reakcji racemizacji pierwszego rzędu. Bardziej szczegółowe dane na ten temat można znaleźć w publikacjach [33,35]. Równanie reakcji racemizacji aminokwasów można w sposób ogólny przedstawić następująco:



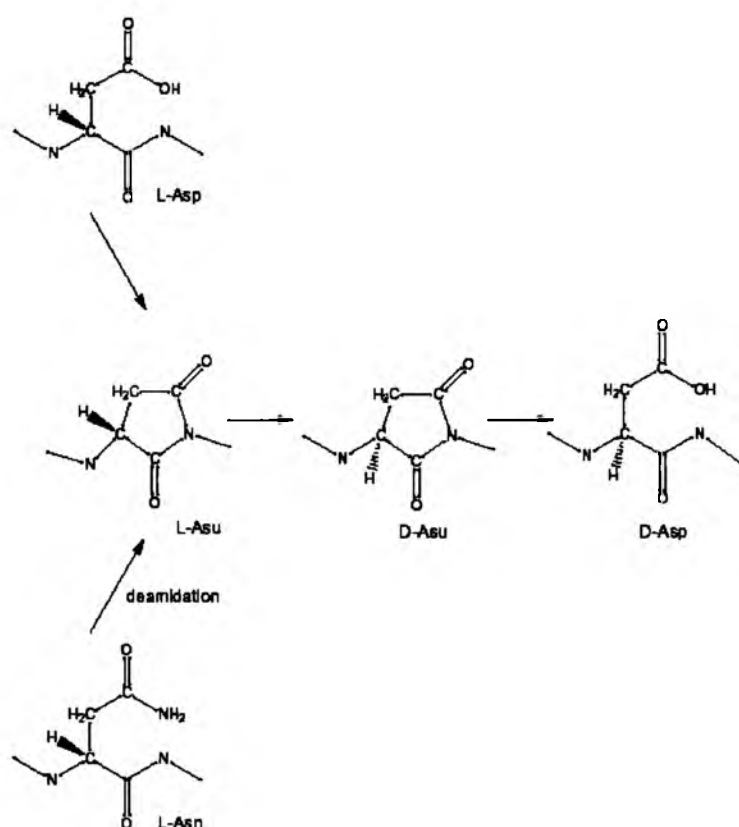
gdzie: k_L i k_D są odpowiednio stałymi szybkości reakcji pierwszego rzędu dla reakcji przemiany enancjomeru L w D i odwrotnie.

2.2.2. Racemizacja związanych aminokwasów –wpływ wybranych czynników na szybkość reakcji

Badanie racemizacji związanych aminokwasów przeprowadzano dla bardzo zróżnicowanych swoim charakterem chemicznym próbek. Były to między innymi:

- polipeptydy [36,37],
- kolagen obecny w kościach [38],
- zęby [39],
- skorupki jajek [40] (i inne).

Prosty mechanizm tworzenia się płaskiego karboanionu nie wyjaśnia zaobserwowanej, stosunkowo dużej szybkości reakcji racemizacji związanego kwasu asparaginowego w porównaniu ze znacznie mniejszą szybkością w przypadku związanej seryny i treoniny [41]. Zarówno dla kwasu asparaginowego, jak i asparaginy formą przejściową w reakcji racemizacji jest imid kwasu bursztynowego. Szczegółowo proces ten przedstawiono na poniższym rysunku.



Rys.8. Reakcja racemizacji kwasu *L*-asparaginowego (*L*-Asp) i deamidowanie *L*-asparaginy prowadzące do otrzymania kwasu *D*-asparaginowego, wraz z imidem kwasu bursztynowego (Asu) jako formą pośrednią [42]

Wynikiem procesu racemizacji kwasu *L*-asparaginowego, jak i *L*-asparaginy jest kwas *D*-asparaginowy.

2.2.2.1. Struktura cząsteczkowa

Ogólnie na podstawie doświadczeń wiadomo, że związane aminokwasy ulegają szybszej racemizacji, niż wolne aminokwasy [43]. Sekwencja aminokwasów istotnie wpływa na szybkość reakcji hydrolizy (czyli na rozpad wiązań peptydowych w łańcuchach białek) i w konsekwencji, również na szybkość reakcji racemizacji poszczególnych aminokwasów. Z czasem łańcuchy te stają się coraz krótsze, aż do momentu powstania wolnych aminokwasów [25]. Szybkość reakcji hydrolizy zależy nie tylko od energii poszczególnych wiązań peptydowych (która z kolei zależy od struktury aminokwasów połączonych wiązaniami peptydowymi), a także od obecności wody i temperatury [44].

2.2.2.2. Odczyn roztworu

Wiązania peptydowe ulegają hydrolizie w środowisku o pH = 3 lub niższym, więc hydroliza kwasowa jest powszechnie stosowana do degradacji łańcuchów białkowych i uzyskania poszczególnych aminokwasów w wolnej postaci. Całkowitą hydrolizę wiązań peptydowych można osiągnąć przez ogrzewanie białek w pięcio- lub sześciomolowym roztworze kwasu chlorowodorowego [25]. Duża szybkość racemizacji kwasu asparaginowego w martwych fragmentach materiału kostnego jest niezależna od wartości pH w przedziale 3-9. Podejrzewa się, iż materiał kostny stanowi pewnego rodzaju bufor stabilizujący pH całego układu, a zatem odczyn środowiska nie wpływa w sposób znaczący na reakcję racemizacji w materiałach archeologicznych [29].

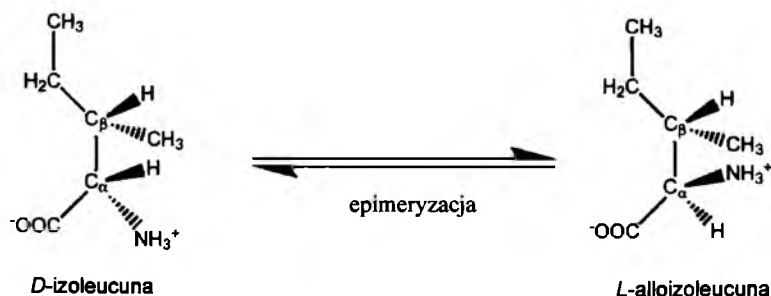
Proces degradacji łańcuchów białkowych na drodze hydrolizy wiązań peptydowych wymaga obecności wody. Kości wykazują porowatą strukturę, która umożliwia zatrzymanie wody nawet w środowisku bezwodnym. Zarówno proces hydrolizy, jak i racemizacji ulega wstrzymaniu po wysuszeniu materiału kostnego, natomiast ogrzewając materiał kostny w obecności wody wypłukuje się większość aminokwasów. Proces taki może doprowadzić nie tylko do wymycia aminokwasów z próbki, ale także do jej zanieczyszczenia i zafałszowania wyników oznaczania proporcji między prawo- i lewoskrętnymi enancjomerami [45].

2.2.2.3. Temperatura

Tak jak w przypadku wolnych aminokwasów, również w przypadku aminokwasów związanych wzrost szybkości ich racemizacji jest proporcjonalny do wzrostu temperatury. Na podstawie przeprowadzonych badań Bada i współpracownicy [46,47] wysnuli wniosek, że kwas asparaginowy, alanina, kwas glutaminowy, leucyna oraz izoleucyna związane w kościach ulegają reakcji racemizacji pierwszego rzędu. Niemniej jednak, nawet małe niepewności w „temperaturowej historii” próbki mogą prowadzić do dużych niepewności co do ustalenia jej wieku.

W celu doprecyzowania metody datowania materiału kostnego opracowano metodę kalibracji datowania w oparciu o reakcję racemizacji kwasu asparaginowego (*aspartic acid racemization*, AAR) [47,48]. Mianowicie zestawiano wydajność racemizacji tego kwasu z wynikami pochodzącymi z metody datowania przy użyciu węgla radioaktywnego ^{14}C dla kostnej próbki kalibracyjnej, tym samym tworząc punkt odniesienia dla datowania innych materiałów kostnych metodą AAR. Taki punkt odniesienia stosowano następnie w odniesieniu do innych próbek pochodzących z tego samego znaleziska archeologicznego, co do których podejrzewa się tę samą historię temperaturową, ale w których zawartość radioaktywnego izotopu węgla ^{14}C jest zbyt niska do jego oznaczenia.

Metoda datowania materiału kostnego AAR jest szeroko stosowana do szacowania wieku w różnych typach znalezisk archeologicznych. Reakcja epimeryzacji izoleucyny i reakcja racemizacji kwasu asparaginowego są najpowszechniej używanymi do datowania reakcjami chemicznymi. Reakcja epimeryzacji izoleucyny zachodzi na tyle wolno, iż jest często wykorzystywana do określania wieku znalezisk archeologicznych w przedziale wiekowym od 20000 do 200000 lat, których historia temperaturowa zawiera się w przedziale $18 - 24\text{ }^{\circ}\text{C}$ [49]. W przypadku, gdy mamy do czynienia z niższymi temperaturami, istnieje możliwość datowania jeszcze starszych obiektów.



Rys.9. Epimeryzacja izoleucyny w alloizoleucynę [23]

Kwas asparaginowy ulega stosunkowo szybko reakcji racemizacji i jest używany do datowania próbek, których wiek szacuje się na 80000 lat, w zależności od temperatury. Istnieje także możliwość datowanie kilkusetletnich próbek przy pomocy metody AAR, ale tylko w połączeniu z innymi wiarygodnymi metodami datowania [50]. Z powodu złożoności kinetyki i diagenety kwasu asparaginowego i asparaginy, wiarygodność tej metody datowania jest ciągle tematem licznych dyskusji [51,52,53].

Większość kontrowersji pojawiających się w kontekście datowania metodą AAR dotyczy datowania szczątków ludzkich w Ameryce Północnej [54]. Bada i współpracownicy [55] na podstawie analizy materiału kostnego z Del Mar w Kalifornii określili datę pojawienia się Paleoindianina na około 48000 lat. Datowania tego dokonano w odniesieniu do „czaszki z Laguny”, której wiek początkowo oceniano na około 17000 lat. Kolejne publikacje opisywały datowanie większej ilości próbek z Kalifornii jako pochodzących sprzed 35000 do 48000 lat [56], a nawet sprzed 70000 lat, co konkretnie dotyczyło szkieletu z Sunnyvale. Wyniki tych badań cofają przybycie człowieka na kontynent amerykański o około 35000 lat względem tego, co pierwotnie przypuszczano, jakkolwiek kwestia ta nadal pozostaje otwarta.

Przedstawione powyżej informacje dotyczące datowania metodą AAR wskazują na wady, jak i na zalety tej metody, niemniej jest ona uznawana jako komplementarna w odniesieniu do innych metod chronometrycznych.

2.2.2.4. Chromatografia gazowa w datowaniu znalezisk archeologicznych

Pierwsze bezpośrednie rozdzielanie enancjomerów techniką chromatograficzną zostały przeprowadzone w latach 60-tych XX wieku przez zespół naukowców z Instytutu Weizmanna (Rehovot, Izrael), kierowany przez pioniera chromatograficznych rozdzielów enancjomerycznych, prof. Emanuela Gil-Ava [57,58]. Rozdzielały te zostały zrealizowane najlepiej w owym czasie rozwiniętą techniką chromatograficzną, jaką była podziałowa chromatografia gazowa. Gil-Av i współpracownicy zastosowali do tego celu technikę chiralnej podziałowej chromatografii gazowej z kolumnami kapilarnymi. Pierwszą chiralną fazą stacjonarną, zastosowaną w tej technice był laurynian trifluoroacetylo-*L*-leucyny. Na tej właśnie fazie stacjonarnej udało się po raz pierwszy rozdzielić i ilościowo oznaczyć wybrane antymery dwudziestu podstawowych α -aminokwasów (na samym początku były to antymery alaniny i waliny) w postaci odpowiednich estrów trifluoroacetyloalkilowych). Pierwsze podsumowanie tych pionierskich prac badawczych zostało przedstawione w publikacjach [59,60].

Zespół Gil-Ava był również jednym z pierwszych, który wykorzystał chiralną podziałową chromatografię gazową do datowania znalezisk archeologicznych. Najczęściej datowanie to jest oparte na określeniu stopnia racemizacji kwasu *L*-asparaginowego w skamielinach pochodzenia organicznego i w związku z tym technika chiralnej podziałowej chromatografii gazowej zastosowana do określenia ilościowych proporcji między enancjomerami *L* i *D* kwasu asparaginowego stanowi bardzo użyteczne narzędzie archeologicznej chronometrii. Uwieńczone sukcesem datowanie przy zastosowaniu chiralnej podziałowej chromatografii gazowej zostało przeprowadzone przez zespół Gil-Ava w odniesieniu do jednego z największych odkryć archeologii biblijnej i śródziemnomorskiej XX wieku, jakim były słynne zwoje znad Morza Martwego, czyli inaczej rękopisy z Qumran. Badaniu stopnia racemizacji kwasu *L*-asparaginowego został w tym przypadku poddany pergamin, na którym wzmiankowane zwoje zostały sporządzone, a wyniki tych badań opublikowano w dość sensacyjnej w owym czasie pracy [61]. Zespół pod kierownictwem Gil-Ava przeprowadził zresztą znacznie więcej badań, związanych z archeologią biblijną i śródziemnomorską oraz chronometrią (np. [62]).

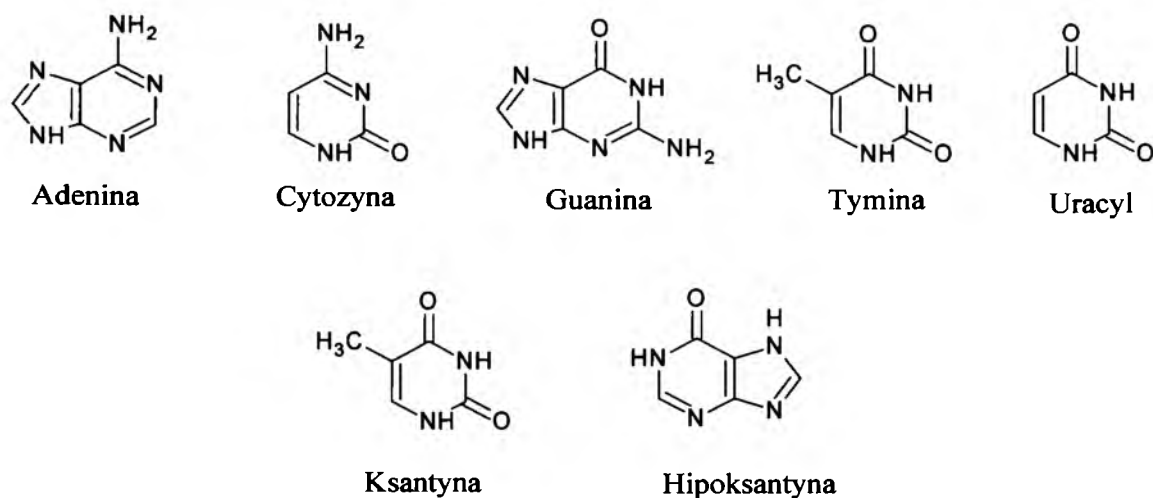
Chromatografia gazowa nadal służy jako jedno z najlepszych narzędzi analitycznych do enancjomerycznych rozdziałów aminokwasów, a także do określania ilościowych proporcji między kwasem *L*- i *D*-asparaginowym, i dlatego jej zastosowanie w chronometrii archeologicznej jest wciąż szerokie.

2.3 Badanie znalezisk pochodzenia pozaziemskiego.

Według klasycznej koncepcji Haldane'a – Oparina początki życia na Ziemi pojawiły się około trzy do czterech miliardów lat temu. Podczas procesu powstawania planet wydzielały się gazy, które dały początek pierwotnej atmosferze ziemskiej. Składała się ona głównie z pary wodnej i z wodoru. Sukcesywnie wraz ze spadkiem temperatury, para wodna ulegała skropleniu, co doprowadziło do powstania na Ziemi rozległych oceanów. Woda wypłukiwała ze skał minerały, tworząc tak zwany „prabulion”. W jego skład wchodziły pierwsze aminokwasy, z których być może powstały proste białka i nukleotydy. Jednak klasyczna teoria nie wyjaśnia w swej istocie powstania załączków biologicznego istnienia na Ziemi.

Jednym z najbardziej fundamentalnych odkryć współczesnej nauki jest przechowywanie, transkrypcja i translacja genomu człowieka [63]. Kwasy nukleinowe zbudowane są z jednostek zwanych nukleotydami. Każdy taki nukleotyd zawiera purynową

lub pirymidynową zasadę, cukier oraz grupę ortofosforową. Zasady wchodzące w skład nukleotydu to aromatyczne związki zawierające atomy azotu. Do grupy pirymidyn zaliczamy uracyl, tyminę oraz cytozynę. Z kolei do puryn należą adenina, guanina, ksantyna oraz hipoksantyna (rys.10.). Adenina, guanina oraz cytozyna wchodzą w skład kwasu rybonukleinowego (RNA) oraz dezoksyrybonukleinowego (DNA). Jedynie tymina oraz uracyl występują tylko w jednym rodzaju kwasu, odpowiednio w DNA i RNA. Ksantyna oraz hipoksantyna nie występują w kwasach nukleinowych, jednakże są ważnymi produktami przejściowymi, zarówno w procesie syntezy, jak i degradacji czystych nukleotydów.



Rys.10. Struktury aminokwasów wchodzących w skład DNA i RNA

Aminokwasy posiadają stosunkowo prostą strukturę. Istnieje dwadzieścia podstawowych aminokwasów, które są budulcem białek wchodzących w skład wszystkich organizmów żywych. Aminokwasy mogą występować w postaci enancjomerów lewo- i prawoskrętnych, ale białka żywych organizmów muszą być zbudowane tylko z jednego rodzaju aminokwasów. Nad pochodzeniem substancji wchodzących w skład nukleotydu zastanawiano się od dawna. Jednym z proponowanych źródeł pochodzenia elementów kodu genetycznego na geologicznie młodej Ziemi mogły być reakcje związków nieorganicznych przebiegające w pierwotnych warunkach, jakie na niej wówczas panowały. Próbe odtworzenia w skali mikro właśnie takiego środowiska, jakie prawdopodobnie istniało wówczas w atmosferze globu ziemskiego, podjął Miller, co omówiono w podrozdziale 2.1 [64,65]. Jednak, co warto podkreślić, Miller w swoim eksperymencie otrzymał zarówno

lewoskrętne, jak i prawoskrętne aminokwasy, a klasyczna teoria powstania życia do chwili obecnej nie potrafi wytłumaczyć zjawiska homochiralności żywych organizmów.

Ziemia u początków swego istnienia z pewnością nie była środowiskiem przyjaznym procesom prowadzącym do powstania życia. Nawet wówczas, gdy warunki naturalne uległy stabilizacji, Ziemia była nieustannie bombardowana przez meteoryty, a ich uderzenia były tak silne, iż niektóre bombardowania przybierały rozmiar katastrof. Wraz z ustaniem deszczu meteorytów, na Ziemi powstały warunki umożliwiające rozwój życia. Być może hipoteza o przybyciu życia na Ziemię z przestrzeni kosmicznej nie jest więc zupełnie nieuzasadniona.

Jako potencjalnie alternatywne źródło nukleotydów wskazano obiekty pochodzenia pozaziemskiego. Wśród takich obiektów możemy wyróżnić komety, asteroidy, ich fragmenty, lub po prostu cząstki pyłu międzyplanetarnego [66]. Chondryty, a więc meteoryty kamienne, będące fragmentami skał, które w wyniku katastrofalnych zderzeń zostały odłupane od większych całości, przez pewien czas krążyły wokół Słońca, a następnie spadły na Ziemię. Obiekty te, zawierające węgiel i wiele pozostałości biologicznych, były analizowane przez liczne i niezależne zespoły badawcze [67,68,69,70,71]. Do analizy wykorzystywano różne instrumentalne techniki analityczne, na przykład chromatografię gazową z detektorem mas [68,72,73], czy wysokosprawną chromatografię cieczową z detektorem UV (HPLC) [74].

Przebadano wiele ciał pochodzenia pozaziemskiego, a najbardziej znane z nich to meteoryty Orgueil, Murray, Allende oraz Murchison. Ze źródeł literaturowych wynika, że meteoryt Murchison został przebadany stosunkowo najdokładniej. Spadł on na południu Australii w 1969 roku, a swoją nazwę zawdzięcza niewielkiej miejscowości położonej nad rzeką Goulburn w stanie Victoria. Jego masa była w przybliżeniu równa stu kilogramom, co pozwoliło na jego staranną analizę. Murchison jest chondrytem węglistym i znaleziono w nim ponad siedemdziesiąt aminokwasów, z których około pięćdziesięciu nie występuje na Ziemi. Ponadto oznaczono w nim takie aminokwasy, jak kwas α -aminoizomasłowy czy racemiczną izowalinę, które niezwykle rzadko występują na Ziemi [75]. Analiza ksantyny oraz uracylu ujawniła, że izotopy węgla ^{13}C i azotu ^{15}N zawarte w tych właśnie związkach pochodzenia ziemskiego występują w zupełnie odmiennych i niższych proporcjach, aniżeli w meteorycie Murchison [76]. Mianowicie węgiel i azot w przyrodzie występuje w postaci izotopów stabilnych. Węgiel ^{12}C i ^{13}C występuje odpowiednio w ilościach 98,9% i 1,1%, natomiast azot ^{14}N i ^{15}N odpowiednio w ilościach 99,634% i 0,366%. Tymczasem w meteorycie Murchison zawartość pierwiastka ^{13}C była o ok. 23,1% większa od ilości występującej na Ziemi, a azotu ^{15}N o ok. 90% większa [77]. Istnieje zatem przypuszczenie, że to właśnie aminokwasy przybyły na Ziemię wraz z meteorytami podobnymi do Murchisona

mogły zapoczątkować na niej życie [78,79]. Z drugiej strony prawdą jest również to, że w pewnym momencie na Ziemi powstały warunki dogodne do samoistnej syntezy aminokwasów. Jako najważniejszy czynnik sprzyjający tej syntezie naukowcy wskazują utleniające właściwości atmosfery [80].

Powyższe poglądy nie są jedynymi, dotyczącymi pochodzenia życia na Ziemi. Na ten temat istnieje również wiele innych teorii, lepiej lub gorzej uzasadnionych doświadczalnie. Jedną z takich teorii sformułował Rasmussen, który w oceanach na głębokości około jednego kilometra w pobliżu ujść hydrotermalnych odkrył istnienie pewnego rodzaju proteobakterii, noszących nazwę archebakterii, lub archeanów [81]. Ujścia hydrotermalne są to położone na dnie oceanów miejsca erupcji gorącej i wysoko zmineralizowanej wody, zawierającej również gazy wulkaniczne. Być może to jest swoisty rodzaj zachowanego do dziś „prabulionu”, w którym w sposób naturalny ze składników nieorganicznych powstają właśnie archeany.

3. Hydroksykwasy karboksylowe i ich znaczenie biologiczne.

„Kobieta ma być nieco brzydsza od anioła, mężczyzna nieco ładniejszy od diabła” — napisał francuski pisarz i filozof François de La Rochefoucauld. Kanony kobiecej urody zmieniają się nieprzerwanie od wieków. W każdym stuleciu obowiązują inne wzory piękna. Już w starożytności piękno utożsamiano z kobietą. Idealem kobiecej urody była zgrabna sylwetka i gładka skóra. Kobiety starożytne wykazywały się dużą zaradnością i pomysłowością w dbaniu o swój wygląd. Z historii wiemy, że legendarna władczyni Egiptu Nefretete dbała o to, by jej cera była alabastrowa, używała więc jasnej ochry i unikała słońca. Kleopatra, królowa Egiptu, zażywała kąpieli z mleka, które wygładzało skórę i powodowało, że stawała się ona jasna. Kanon pięknej i zadbanej skóry obowiązuje do dzisiaj. Ciało staje się „pierwszym ubraniem”, które można a nawet trzeba modelować według obecnie panujących kryteriów piękna. Zatem zacznijmy od początku – oto skóra.

3.1. Skóra i jej znaczenie

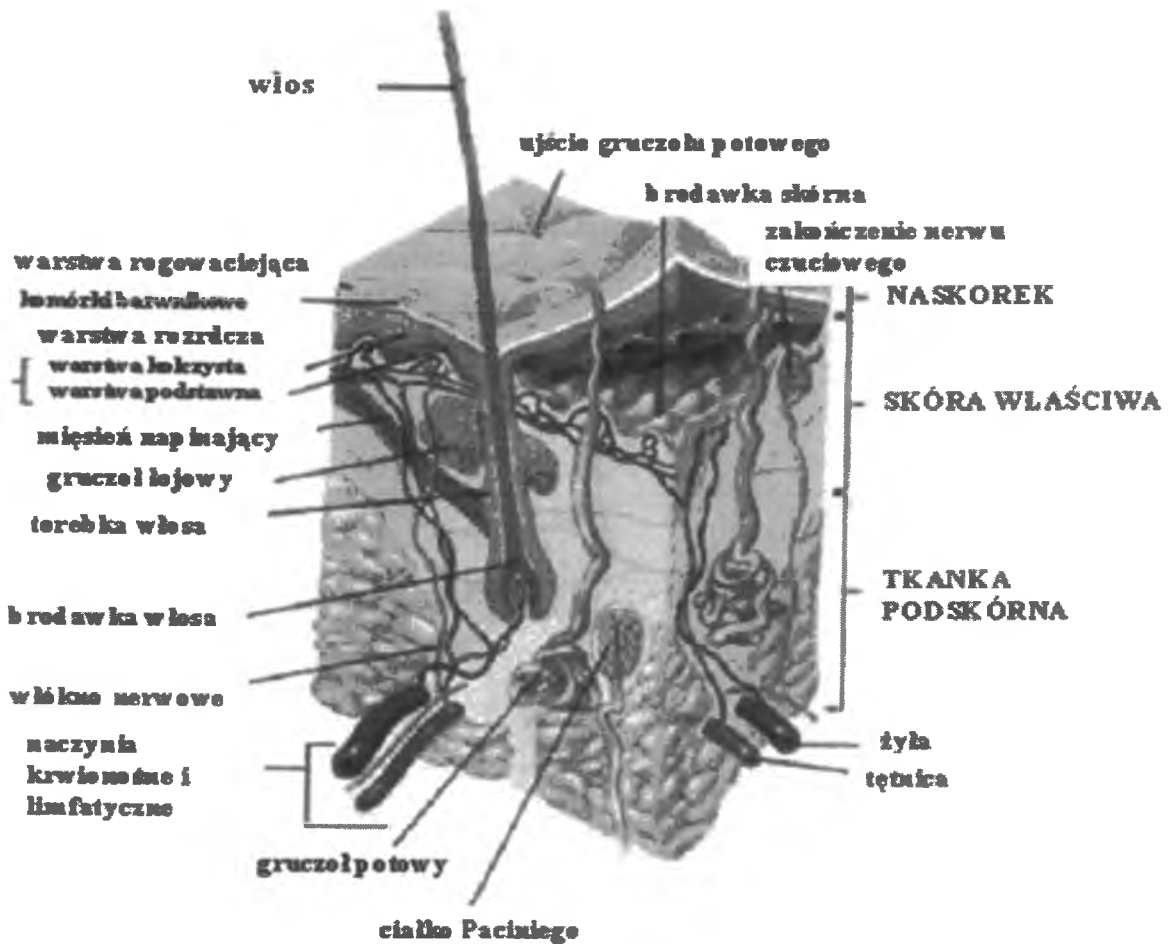
3.1.1. Budowa skóry

Skóra to jeden z największych i najważniejszych organów naszego ciała, którego powierzchnia może dochodzić do 2 m², a jej ciężar może wynosić nawet 20 kg. Jej budowa i działanie są bardzo złożone. W jej skład wchodzi:

1. Naskórek (*Epidermis*) - warstwa zewnętrzna pełniąca funkcję ochronną i rozrodczą, która posiada barwnik - melaninę, nadającą włosom i skórze odpowiednią barwę; naskórek dzieli się na 4 lub 5 warstw, w zależności od grubości. Są to (licząc od warstwy położonej najgłębiej):
 - a. warstwa podstawna (*Stratum basale*);
 - b. warstwa kolczysta (*Stratum spinosum*);
 - c. warstwa ziarnista (*Stratum granulosum*)
 - d. warstwa jasna (*Stratum lucidum*) - tylko w miejscach gdzie skóra jest gruba - na podeszwach stóp, zwłaszcza na piętach i na wewnętrznej stronie dłoni
 - e. warstwa rogowa (*Stratum corneum*), która dzieli się na warstwę zbitą (*Stratum compactum*) i warstwę rogowaciejącą (*Stratum disjunctum*), skóry właściwej i tkanki podskórnej.

2. Skóra właściwa (*Cutis vera*) - warstwa środkowa, zawiera receptory, naczynia krwionośne, nerwy i inne gruczoły, np. gruczoły potowe, jest to warstwa odżywcza i wspierająca (ma od 1 do 3 mm grubości);
3. Tkanka podskórna (*Hypodermis, tela subcutanea*)- warstwa najgłębsza, zbudowana z tkanki łącznej luźnej. Tkanka ta zawiera komórki tłuszczowe i izoluje przed nagłymi zmianami temperatury.

Naskórek stanowi zewnętrzną część skóry i odpowiada za ochronę całego organizmu.



Rys.11 Budowa skóry [82]

Komórki naskórka żyją ok. 28 dni i ulegają nieustannej odnowie. Produkowane są w warstwie podstawowej naskórka, gdzie dojrzewają, a następnie obumierają i ulegają eksfoliacji w warstwie rogowej naskórka.

3.1.2. Funkcje skóry

Skóra – zewnętrzna powłoka organizmu – ma skomplikowaną budowę, która jest w odpowiedni sposób zintegrowana z funkcjami, jakie pełni. Jej główną rolą, jako zewnętrznej powłoki, jest jednocześnie oddzielenie i połączenie organizmu ze środowiskiem zewnętrznym. Skóra pełni również istotną rolę w odbieraniu bodźców zewnętrznych, jak i pomaga przekazywać informacje na zewnątrz (np. mimika, czy wydzielanie substancji chemicznych – feromonów). Skóra jest barierą, która oddziela organizm od otoczenia oraz zatrzymuje wodę i płyny tkankowe w organizmie. Stanowi również ochronę przed mikroorganizmami i substancjami szkodliwymi dla organizmu, nie pozwalając na ich wniknięcie. Kolejną ważną funkcją skóry jest obecność komórek tłuszczowych, włosowatych naczyń krwionośnych oraz gruczołów potowych, które pełnią bardzo ważną rolę w procesach termoregulacji organizmu. Obecne w skórze zakończenia nerwowe, które są czułe na bodźce zewnętrzne, odbierają informacje ze środowiska i przekazują je do centralnego układu nerwowego. Pozwala to na wyzwolenie reakcji odruchowych w sferze motorycznej [83].

Ciało człowieka w 70% jest zbudowane z wody. Woda jest zatem niezbędnym czynnikiem dla prawidłowego funkcjonowania ciała. Stanowi ona podstawowy składnik płynu międzykomórkowego i cytosolu, wypełniającego wnętrza komórek oraz krwi. Jest płynem, w którym przebiegają niemal wszystkie przemiany fizjologiczne i przemiany biochemiczne. Nawet niewielki niedobór wody w skórze prowadzi do upośledzenia przemian biochemicznych, mogąc doprowadzić do poważnych zakłóceń w procesach odnowy tkankowej i do rozregulowania systemów ochronnych. Woda jest niezbędnym elementem, dzięki któremu procesy biochemiczne oraz zachowanie odpowiedniej struktury przebiegają w prawidłowy sposób. Przykładem może być rogową warstwę naskórka, w której brak odpowiedniej ilości wody prowadzi do powstania stosunkowo grubej warstwy suchych komórek. Skóra staje się wówczas szorstka i łatwo pęka. Oczywiście na utratę wody w rogowej warstwie naskórka ma wpływ przede wszystkim jego stan, czyli jego przepuszczalność. Prawidłowo funkcjonujący naskórek jest najważniejszą barierą ograniczającą utratę wody. Możemy wymienić cztery czynniki hamujące migrację wody na powierzchnię naskórka:

1. sebum – ciała tłuszczowe, które są wydzielane przez gruczoły łojowe;
2. substancje higroskopijne wydzielane z potem;
3. ciała tłuszczowe cementu międzykomórkowego w warstwie rogowej;
4. substancje higroskopijne, znajdujące się w warstwie rogowej.

Naturalne mechanizmy hamujące utratę wody często okazują się niewystarczające i wymagają wspomagania odpowiednimi kosmetykami [84].

3.2. Historia hydroksykwasów

Kłopoty z cerą dotyczą nie tylko nas. Nie były one obce w starożytnym Egipcie, ani też XIX-wiecznym Francuzkom, Polinezyjkom czy naszym prababkom. Wykorzystywały one dary natury, aby poprawić wygląd cery. W taki oto sposób nieświadomie rozpoczęła się rewolucja, której na początku lat siedemdziesiątych XX wieku właściwy bieg nadali Eugene Van Scott i Ruey Yu [85]. Jako pierwsi odkryli oni, że hydroksykwasy (HAs) z grupą hydroksylową w pozycji α lub β mają specyficzny wpływ na hiperkeratynizację (nadmierne rogowacenie naskórka), działają leczniczo na „chorą” skórę oraz na jej proces starzenia [86,87,88]. Hydroksykwasy są reprezentowane przez α -hydroksykwasy, β -hydroksykwasy, polihydroksykwasy i kwasy bioniczne. Składniki te wspólnie tworzą klasę związków o niezrównanym dobrodziejstwie dla skóry i można je spotkać zarówno w preparatach leczniczych, jak i w kosmetykach, wykorzystywanych jako substancje przeciwdziałające starzeniu skóry oraz w leczeniu trądziku i przebarwień.

3.2.1. Podział hydroksykwasów

3.2.1.1. α – Hydroksykwasy (AHA)

AHA są organicznymi kwasami karboksylowymi z jedną grupą hydroksylową położoną w pozycji α w stosunku do karboksylowego atomu węgla. Grupa hydroksylowa i karboksylowa są bezpośrednio związane z alifatycznym lub alicyklicznym atomem węgla. Grupa hydroksylowa w AHA jest obojętna i tylko grupa karboksylowa nadaje kwaśny charakter związkowi. Wiele AHA jest obecnych w żywności i owocach, i dlatego też często są nazywane kwasami owocowymi. Kwas glikolowy, najmniejszy z kwasów AHA, występuje w trzcinie cukrowej i jest jednym z najczęściej używanych AHA w zabiegach pielęgnacyjnych skóry. Kolejnym niskocząsteczkowym kwasem AHA jest kwas mlekowy,

który również jest szeroko stosowany w preparatach do eksfoliacji i przeciwdziałających starzeniu się skóry.

Skuteczność AHA wynika z ich wielokierunkowego działania. Zdają się być bezpieczne i efektywne, co jest jednym z najważniejszych kryteriów branych pod uwagę w ocenie kosmetyków. Do najpopularniejszych i najczęściej stosowanych w kosmetyce i kosmetologii α -hydroksykwasów należą:

- ❖ kwas glikolowy
- ❖ kwas mlekowy
- ❖ kwas winowy
- ❖ kwas cytrynowy
- ❖ kwas jabłkowy

3.2.1.2. β -Hydroksykwasy (BHA)

BHA są organicznymi kwasami karboksylowymi, posiadającymi jedną grupę hydroksylową położoną w pozycji β w stosunku do karboksylowego atomu węgla. Grupa hydroksylowa jest z natury obojętna, a grupa hydroksylowa odpowiada za kwasowy charakter BHA. Niektóre BHA, jak np. kwas β -hydroksybutanowy, są obecne w tkankach ciała, jako pośrednie metabolity i źródło energii. Występują również takie hydroksykwasy, które są jednocześnie AHA i BHA ze względu na obecność grupy hydroksylowej w pozycji α w stosunku do jednej grupy karboksylowej i w pozycji β do drugiej grupy karboksylowej. Na przykład kwas jabłkowy zawiera w swojej budowie jedną grupę hydroksylową i dwie grupy karboksylowe, kwas cytrynowy posiada jedną grupę hydroksylową i trzy grupy karboksylowe itp.

Podstawową różnicą między kwasami AHA, a BHA jest wielkość ich cząsteczek. Alfa-hydroksykwasy z reguły mają mniejsze cząsteczki, dzięki czemu głębiej penetrują skórę, natomiast beta-hydroksykwasy mają większe cząsteczki, a zatem działają płycej i mniej agresywnie. Ponadto kwasy AHA są rozpuszczalne w wodzie i nie mają zdolności przenikania przez sebum skóry, natomiast BHA są rozpuszczalne w tłuszczach [89]

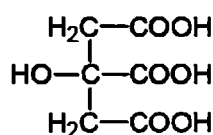
Kwasy BHA wykorzystywane są w kosmetyce od 1995 roku [90]. Ich działanie polega przede wszystkim na zmniejszeniu przylegania komórek warstwy rogowej naskórka, dzięki czemu odblokowują ujścia gruczołów łojowych i ułatwiają usuwanie martwych komórek naskórka, co z kolei pozwala zapobiegać tworzeniu się zapalnych zmian trądzikowych. Kwasy te mają również pewne działanie antybakteryjne. Głównym przedstawicielem beta-

hydroksykwasów jest kwas salicylowy, który w niskich stężeniach (tj. rzędu 0,2%) wykorzystywany jest w kosmetykach przeznaczonych do pielęgnacji skóry trądzikowej, a w wyższych (rzędu 5-10%) wykazuje silne działanie złuszczące i jest stosowany np. w leczeniu łuszczycy.

3.2.2. Wybrane hydroksykwasy o istotnym znaczeniu biologicznym

3.2.2.1. Kwas cytrynowy

Poniżej przedstawiono wzór kwasu 2-hidroksy-1,2,3-propanotrikarboksylowego:



Rys.12. Wzór kwasu cytrynowego [91].

Kwas 2-hidroksy-1,2,3-propanotrikarboksylowy, zwany kwasem cytrynowym (CA), jest naturalnym składnikiem tkanek roślinnych oraz organizmów ludzkich i zwierzęcych [92]. Obecny jest również w dużych ilościach w owocach, głównie cytrusowych, skąd wywodzi się jego nazwa zwyczajowa. W owocach, w których dominuje jako jeden ze składników, stanowi około ośmiu procent suchej masy.

Odkrycie kwasu cytrynowego przypisuje się Jabirowi Hayyanowi, znanemu również jako Geber, perskiemu alchemikowi z VIII w.n.e. Jednak po raz pierwszy został on wyizolowany w 1784 roku przez szwedzkiego chemika Carla Wilhelma Scheele, który wykrystalizował go z soku cytryny. Wyodrębnienie kwasu cytrynowego z owoców należy jednak do bardzo kosztownych procesów i dlatego dla celów przemysłowych jest on pozyskiwany z glukozy lub maltozy na drodze fermentacji przy użyciu pewnych gatunków pleśni (*Citromyces*).

Fermentacja prowadząca do uzyskania kwasu cytrynowego po raz pierwszy została zaobserwowana przez Wehmera w 1893 roku. Wykrył on w kulturach pędzlaków szczep umożliwiający fermentację i nazwał go *Penicillium glaucum*. Po dwóch latach wyizolowano kolejne dwa szczepy *Citromyces* (*Penicillium*), które miały zdolność gromadzenia kwasu cytrynowego, jednak nie udało się tego zjawiska wykorzystać na skalę przemysłową. Dopiero

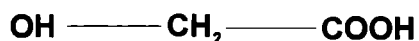
praca Currie stworzyła przemysłowe podstawy produkcji kwasu cytrynowego dzięki odkryciu, że szczep *Aspergillus niger* produkuje znaczne ilości kwasu cytrynowego i dobrze rozwija się na pożywkach płynnych o pH 2,5 – 3,5 [93]. Światowa produkcja kwasu cytrynowego jest obecnie szacowana na około 1,4 miliona ton [94]. Głównym mikroorganizmem do produkcji kwasu cytrynowego są grzyby strzępkowe *Aspergillus niger*. Jednak w ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się drożdżom z gatunku *Yarrowia lipolytica* [95, 96, 97]. Szczepy te wykorzystują tylko nieliczne cukry takie, jak glukoza, czy fruktoza, co wyklucza możliwość stosowania ich w przypadku sacharozy lub melasy. Inżynieria genetyczna zaradziła również temu problemowi i uzyskano szczep posiadający gen inwertazy, który pozwala na biosyntezę kwasu cytrynowego z czystej sacharozy lub z sacharozy zawartej w melasie [98, 99, 100]. Do 1920 roku kwas cytrynowy był pozyskiwany z soku cytryn, a następnie krystalizowany [92]. Ekstrakcja z owoców cytrusowych jest nadal wykorzystywana, jednak nie jest to tania metoda pozyskiwania tego kwasu [101].

Kwas cytrynowy to substrat niezbędny organizmowi ludzkiemu, bądź zwierzęcemu w łańcuchu reakcji cyklu Krebsa, zwanego również cyklem kwasów trójkarboksylowych. W trakcie zachodzenia tego procesu cukier jest utleniany do dwutlenku węgla i wody z uwolnieniem energii.

Cykl kwasu cytrynowego jest końcowym, wspólnym szlakiem utleniania substratów energetycznych - aminokwasów, kwasów tłuszczowych i węglowodanów. Większość tych cząsteczek wchodzi do cyklu w postaci acetylo-CoA (acetylokoenzymu A). Dostarcza także produktów pośrednich do biosyntezy. Komórki żywe potrzebują energii, zawartej w formie wiązań estru fosforowego znanego jako ATP (adenozynotrójfosforan). Zachodzi to głównie w reakcjach następujących po cyklu Krebsa, dlatego też cykl ten jest niezbędny do oddychania [102].

3.2.2.2. Kwas glikolowy

Alfa hydroksykwasy (AHA) są znane jako kwasy owocowe i od stuleci były wykorzystywane w kosmetykach oraz w wielu innych produktach. Kwas glikolowy (kwas 2-hydroksyoctowy) jest najniższym kwasem z grupy AHA, a jego wzór przedstawia poniższy rysunek:



Rys.13. Wzór kwasu glikolowego.

Alfa-hydroksykwas mają właściwości hydrofilowe i są rozpuszczalne w wodzie. Nie są to substancje toksyczne ani obce względem systemów komórkowych. Wprost przeciwnie, kwas glikolowy działa jednocześnie w dwojaki sposób. Złuszczając martwe komórki naskórka działa on stymulująco na metabolizm energetyczny komórki na poziomie keranocyty, a także fibroblastu (komórki tworzące tkankę łączną właściwą). Są to bardzo istotne procesy komórkowe, które mają fundamentalne znaczenie dla zachowania odpowiedniego poziomu nawilżenia, zawartości i gęstości skóry. Ze względu na jego dwutorowe działanie, kwas glikolowy spełnia istotną rolę w kosmetyce. Występuje on naturalnie w trzcinie cukrowej i po raz pierwszy został zastosowany w dermatologii w 1974 roku. Jako środek pilingujący zyskał powszechną akceptację i szerokie zastosowanie [103,104]. Spośród wszystkich hydroksykwasów jest najbardziej aktywny ze względu na najprostszą budowę molekularną oraz na bardzo niską masę cząsteczkową. Dzięki tym właściwościom możliwe jest jego wnikanie w głębokie warstwy skóry. Kwasy AHA uczestniczą w licznych procesach metabolicznych na poziomie komórkowym, m.in. w glikolizie, cyklu Krebsa, syntezie glikozaminoglikanów oraz syntezie aminokwasów (seryny). W kosmetyce kwas glikolowy stosowany jest w zakresie stężeń od 5 do 70%. Mechanizm jego działania w głównej mierze polega na rozluźnieniu wiązań korneocytów, czyli martwych komórek warstwy rogowej naskórka, doprowadzając do złuszczenia zewnętrznej warstwy rogowej. Zdrowa skóra zbudowana jest z piętnastu warstw korneocytów i każdego dnia człowiek traci jedną do dwóch takich warstw. Kwas glikolowy w wysokich stężeniach (ok. 50 – 70%) przyspiesza złuszczenie naskórka [105] i pobudza fibroblasty stymulując włókna elastyny i kolagenu. Znacząco wpływa też na produkcję mukopolisacharydów, a tym samym podwyższa napięcie skóry oraz redukuje zmarszczki i bruzdy, a także łagodzi efekty „fotostarzenia się” skóry. Wbudowując się w lipidową barierę naskórka powoduje wiązanie wody w skórze i tym samym podnosi stopień jej nawilżenia. Pobudza do pracy włókna sprężyste, przez co poprawia się mikrokrażenie, a skóra jest wygładzona i napięta. Podczas dłuższego stosowania tego kwasu obserwuje się zwiększenie grubości naskórka nawet o 25%. Reasumując, pod wpływem kwasu glikolowego widoczna jest znaczna poprawa stanu skóry przy minimalnym negatywnym efekcie ubocznym. Kosmetologiczne wskazania do stosowania kwasu glikolowego są następujące:

- ❖ nawilżenie,
- ❖ piling,
- ❖ głębokie pobudzenie procesów odnowy komórkowej,

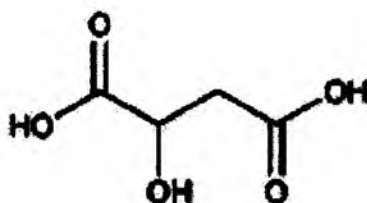
- ❖ przeciwdziałanie procesom starzenia,
- ❖ redukcja zmarszczek,
- ❖ regulacja metabolizmu komórkowego w chorobach trądzikowych,
- ❖ przebarwienia,
- ❖ fotostarzenie się skóry.

Na rynku konsumenckim powraca do łask chwilowo zapomniany preparat o nazwie Glycolac, będący optymalną niebuforowaną mieszaniną najskuteczniejszych kwasów AHA. Kwas glikolowy robi obecnie bardzo dużą karierę jako związek chemiczny o wysokiej skuteczności i jednocześnie o dużej aktywności biochemicznej. Optymalna mieszanina kwasu glikolowego, mlekowego, winowego, cytrynowego, jabłkowego oraz salicylowego daje bardzo znaczące efekty kosmetyczne. Synergistyczne działanie tych substancji prowadzi do odnowy komórkowej, normalizacji keratynizacji, redukcji blizn, wzrostu spoistości, napięcia i zwartości skóry, a nawet do wygładzenia głębszych zmarszczek.

Nowatorski pomysł łączenia różnych kwasów AHA w formie odpowiednich mieszanin pozwala na aktywną penetrację skóry poprzez wykorzystanie właściwości chemicznych ich cząsteczek oraz wiedzy na temat transdermalnego mechanizmu wchłaniania ich przez skórę.

3.2.2.3. Kwas jabłkowy

Kwas jabłkowy (kwas hydroksybutanodiowy) to również kwas z grupy kwasów karboksylowych, a zarazem α -hydroksykwasów.



Rys.14. Wzór kwasu jabłkowego [106]

Kwas jabłkowy także należy do kwasów owocowych i występuje w postaci syntetycznej jako enancjomer *D* oraz w postaci naturalnej jako enancjomer *L*. W środowisku naturalnym możemy go spotkać w wielu ziołach, szczególnie w ich kłęczach oraz w owocach (np. w borówce, żurawinie, jabłoni, głogu, jarzębinie, rzewieniu i tarninie). Po raz pierwszy

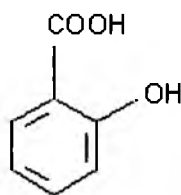
kwask jabłkowy został odkryty, opisany i wyodrębniony z jabłek i agrestu przez szwedzkiego chemika Carla Wilhelma Scheele w 1785 roku.

Kwas jabłkowy uczestniczy w wielu ważnych szlakach metabolicznych, takich jak cykl Krebsa, fotosynteza CAM, szlak Kortschacka, Hatcha i Slacka, a także cykl glioksalanowy. Jako jeden z metabolitów cyklu Krebsa powstaje podczas utleniania kwasu bursztynowego do kwasu fumarowego przez dehydrogenazę bursztynianową. W trakcie tej przemiany dwunukleotyd flawinoadeninowy (FAD utleniony) zostaje przekształcony w FADH₂ (dwunukleotyd flawinoadeninowy zredukowany). W kolejnym etapie dochodzi do przekształcenia kwasu fumarowego do kwasu jabłkowego z udziałem enzymu fumarazy. Podczas tego etapu następuje hydratacja fumaranu, dzięki czemu powstaje kwas jabłkowy. W kolejnym etapie kwas jabłkowy zostaje utleniony do kwasu szczawiooctowego z wykorzystaniem dehydrogenazy jabłczanowej.

Angielskie przysłowie mówi, że jeżeli zjesz choć jedno jabłko dziennie, to zapomnisz o drodze do lekarza. Lecznicze działanie kwasu jabłkowego było już znane w czasach biblijnych. Pierwsze wzmianki o nim znajdują się w Starym Testamencie. W medycynie ludowej kwas jabłkowy był stosowany jako antidotum na wiele chorób. Swoje główne zastosowanie znalazł w profilaktyce dolegliwości reumatycznych, w przeziębieniach, zaburzeniach trawienia, bólach głowy i przy ogólnym osłabieniu. Kuracja kwasem jabłkowym przynosi dobre efekty w leczeniu anginy, astmy, oparzeń, kaszlu, zapalenia tchawicy, grzybicy, trądziku oraz przy odchudzaniu.

Badania prowadzone do tej pory potwierdzają dobroczynne działanie kwasu jabłkowego na reakcje metaboliczne zachodzące w organizmie ludzkim. Owoce to dar od natury, który przywykliśmy traktować jak zwykły, smaczny składnik codziennego pożywienia. Smaczne lekarstwo to dość niezwykle, ale co ważniejsze jest to lekarstwo, którego nie można przedawkować.

3.2.2.4. Kwas salicylowy



Rys.15. Kwas salicylowy

W 1826 roku z kory wierzby wydzielono substancję, którą nazwano w późniejszym czasie salicyną. Była ona stosowana w tradycyjnej medycynie, jako środek przeciwgorączkowy i przeciwbólowy. Tradycja ta jest kontynuowana przez współczesną fitofarmację, która oferuje preparaty o takich samych wskazaniach, jak dawniej. Dwa lata później w procesie hydrolizy salicyny otrzymano kwas salicylowy (kwas *o*-hydroksybenzoesowy), który zaczęto stosować jako lek o silniejszym działaniu. Strukturę kwasu salicylowego oznaczył Hermann Kolbe w 1859 roku i opracował metodę jego syntezy chemicznej z fenolu, która wkrótce została wykorzystana na skalę przemysłową. Pierwsze publikacje dotyczące działania kwasu salicylowego na choroby reumatyczne pojawiły się w 1876 roku (Lancet). Jednak pod koniec XIX wieku zaczęto zastanawiać się nad sporządzeniem leku o analogicznych właściwościach, ale o mniejszych negatywnych skutkach ubocznych [107,108,109]. W taki oto sposób kwas salicylowy stał się prekursorem kwasu acetylosalicylowego czyli aspiryny, salicylanów oraz następnych generacji terapeutyków, tzw. niesteroidowych leków przeciwzapalnych i koks�bów.

Kwas salicylowy wykazuje właściwości przeciwgrzybiczne, przeciwbakteryjne oraz przeciwprzeczerniakiowe. Maści salicylowe znalazły zastosowanie w przypadku przewlekłych owrzodzeń, łupieżu, a także w chorobach pasożytniczych skóry. Stosowany jest również do odkażania ran, płukania jamy ustnej, a w stężonych roztworach do usuwania brodawek skórnych i odcisków.

Nieprzecenione właściwości kwasu salicylowego dostrzegła również kosmetologia i dermatologia. Jego kilkuprocentowe roztwory zapewniają działanie keratolityczne, jednak działanie tych roztworów jest znacznie mniej agresywne, niż w przypadku alfa hydroksykwasy. Podczas stosowania kwasu salicylowego rzadziej pojawiają się efekty uboczne w postaci pieczenia, szczypania i nadmiernego złuszczenia się skóry. Może on być dobrą alternatywą dla osób, które nie mogą stosować alfa hydroksykwasy. Ze względu na swoją budowę jest rozpuszczalny w tłuszczach. Pozwala to na złuszczenie martwego

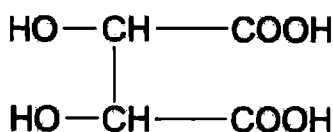
naskórka oraz na jednoczesne przenikanie przez warstwę sebum i wnikanie w głąb skóry, co ma bardzo duże znaczenie przy leczeniu zmian trądzikowych. Efekty stosowania kwasu salicylowego są następujące:

- ❖ przyspieszenie procesów gojenia ognisk zapalnych (np. zmiany trądzikowe) i podrażnień,
- ❖ zmniejszenie posłonecznych i pozapalnych przebarwień skóry,
- ❖ zwiększenie skuteczności działania innych preparatów kosmetycznych,
- ❖ zmniejszenie płytkich blizn potrądzikowych.

Badania prowadzone do tej pory wykazują właściwości lecznicze zarówno dla alfa, jak i beta hydroksykwasów. Doniesienia literaturowe pokazują, że związki te znajdują szerokie zastosowanie. Jednak najistotniejszy jest fakt, że te zbawienne dla nas związki z łatwością możemy znaleźć w codziennym pożywieniu, na przykład w owocach.

3.2.2.5. Kwas winowy

Kwas 2,3-dihidroksybutanodiowy zwany kwasem winowym, to organiczny związek chemiczny z grupy hydroksykwasów dikarboksylowych zawierających dwie grupy hydroksylowe.



Rys.15. Wzór kwasu winowego [110].

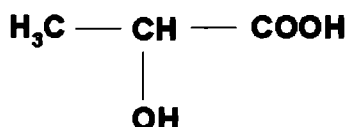
Kwas winowy po raz pierwszy wyizolowano z wodorowinianu potasu, tzw. winnego kamienia, który osadza się w beczkach i kadziach podczas fermentacji wina. Ludwik Pasteur zdołał przy pomocy pęsety i szkła powiększającego rozdzielić optycznie nieaktywny kwas winowy na dwa optycznie czynne składniki, czyli na enancjomery. Posiadają one identyczne właściwości fizyczne i chemiczne, a tym, co je odróżnia, jest kierunek skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego. Odkrycia tego Pasteur dokonał w 1848 roku. Kilka lat później odkryto formę *mezo* kwasu winowego, zapoczątkowując tym samym badania nad izomerią optyczną związków chemicznych [111]. Późniejsze wyjaśnienie tego zjawiska dało podstawę dla rozwoju stereochemii.

Kwas winowy (TA) [112] jest podstawowym składnikiem winogron i wina [113], wnosząc istotną nutę smakową. Ponadto, egzogeny TA, jest używany jako środek zapachowy. W przemyśle spożywczym pełni funkcję regulatora kwasowości, synergenta, wzmacniacza aromatu, stabilizatora barwy i przeciwutleniacza. Kwas winowy na skalę przemysłową jest wytwarzany z odpadów powstałych przy produkcji wina, najczęściej ze skórek winogron. Wykorzystywany jest w produkcji przetworów owocowych, owoców i warzyw w puszkach oraz niektórych wyrobów kakaowych i czekoladowych, a także produktów cukierniczych, napojów bezalkoholowych, marmolady i wina. Wiele roślin syntezuje kwas winowy [114], ale pionierskie prace z 1950 roku wykazały, że cykl metaboliczny TA, w przeciwieństwie do kwasu cytrynowego i jabłkowego, plasuje się poza oksydacyjnym metabolizmem cukrów [115].

Podręczniki toksykologiczne podają, iż kwas winowy zalicza się do substancji silnie toksycznych dla człowieka. Zaledwie dwanaście gramów tego związku stanowi dawkę śmiertelną, która prowadzi do zgonu w przedziale od 12 godzin do 9 dni od zażycia tej dawki. Widoczne objawy to gwałtowne wymioty i biegunki, bóle brzucha i pragnienie, a następnie zapaść sercowo–naczyniowa i/lub ostra niewydolność nerek. Pomimo, iż kwas winowy (E334) znajduje się na liście GRAS, czyli na liście substancji bezpiecznych i nietoksycznych, stosowanych jako dodatek do żywności przetworzonej, należy stale pamiętać o jego toksycznych właściwościach.

3.2.2.6. Kwas mlekowy

Kwas mlekowy to naturalny, chiralny kwas hydroksykarboksylowy, który występuje w dwóch odmianach enancjomerycznych, prawoskrętnej *L*(+) i lewoskrętnej *D*(-). Kwas mlekowy to kwas α -hydroksypropionowy, który po raz pierwszy został opisany w 1780 roku przez szwedzkiego chemika Karla Wilhelma Scheele [1].

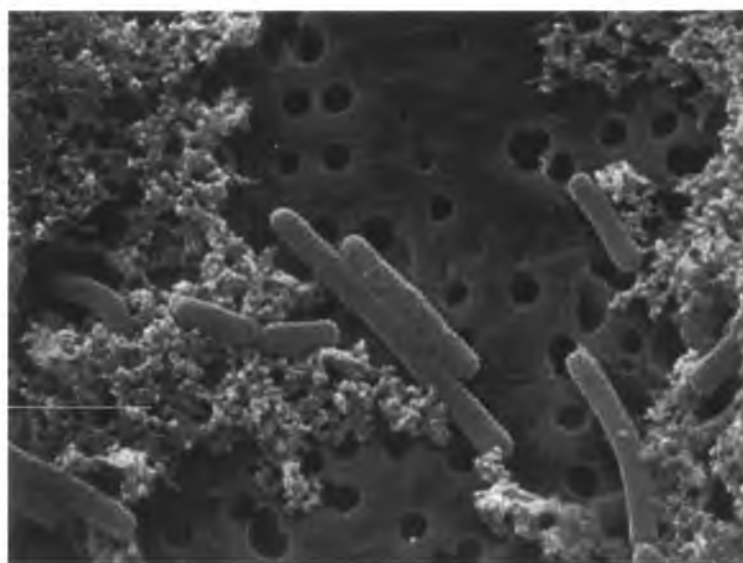


Rys.16. Wzór kwasu mlekowego

Kwas mlekowy powstaje na drodze rozkładu cukru w glikolizie anaerobowej (beztlenowej) przy udziale bakterii beztlenowych *Lactobacillus casei* oraz

Lactobacillus bulgaricus. Po raz pierwszy kwas mlekowy odkryto w kwaśnym mleku, a następnie w mięsie (enancjomer *L*-(+)). Bakterie kwasu mlekowego zasiedlają różne środowiska, między innymi wchodzi w skład flory przewodu pokarmowego, skóry, a także narządów rodnych.

Ponad sto lat temu Ilja Iljicz Miecznikow otrzymał nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny za badania nad odpornością organizmów. Zauważył on, że w niektórych częściach Europy południowej ludzie żyją znacznie dłużej, niż gdzie indziej. Z przeprowadzonych badań wywnioskował, iż pożywienie w tym regionie zawiera znaczną ilość zsiadłego mleka, w którym znajdują się bakterie *Lactobacillus casei*. Mieszkańcy spożywali znaczne ilości zsiadłego mleka, a w ich układzie pokarmowym bakterie te były stale obecne. Bakterie te to pałeczki kwasu mlekowego.



Rys.17. Mikroskopowe zdjęcie pałeczek kwasu mlekowego [116]

Współczesne badania potwierdzają, iż brak bakterii kwasu mlekowego w przewodzie pokarmowym zarówno u ludzi, jak i zwierząt, powoduje większą podatność na zakażenia jelitowe powodujące w konsekwencji zaburzenia drobnoustrojowe przewodu pokarmowego gospodarza. Powstałe w ten sposób zakłócenia w kompozycji flory fizjologicznej układu trawiennego prowadzą między innymi do:

- ❖ usunięcia naturalnych producentów witaminy K i B;
- ❖ zbyt dużego rozwoju bakterii patogennych oraz infekowania organizmu bakteriami i grzybami – dysbakterioza. Końcowym efektem jest upośledzenie wchłaniania tłuszczów, podrażnienie śluzówki przewodu pokarmowego, zaburzenie wchłaniania białek i węglowodanów, i nasilenie przebiegu procesów fermentacyjnych;

- ❖ rzekomobłoniastego zapalenia jelita grubego, którego przyczyną jest przewlekła antybiotykoterapia antybiotykami z grupy aminoglikozydów (neomycyna), linkozamidów (linkomycyna) oraz cefalosporyn (cefazolina).

Lactobacillus acidophilus posiada właściwości zapobiegania i leczenia wymienionych zaburzeń poprzez hamowanie rozwoju bakterii patogennych. Mechanizm działania bakterii kwasu mlekowego polega na eliminowaniu drobnoustrojów chorobotwórczych poprzez:

- ❖ obniżenie pH przewodu pokarmowego do wartości poniżej 4,5;
- ❖ syntezę bakteriocyn – związków antybakteryjnych.

Dzięki swoim dobroczynnym właściwościom bakterie kwasu mlekowego zamieszkując przewód pokarmowy pomagają organizmowi:

- ❖ zapobiegać rozwojowi takich bakterii, jak *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, gronkowiec złocisty, grzyby;
- ❖ zapobiegać powstawaniu procesów gnilnych w jelicie, a co za tym idzie przywracać równowagę drobnoustrojową przewodu pokarmowego;
- ❖ obniżać poziomu cholesterolu;
- ❖ korzystnie działać na proces trawienia poprawiając trawienie i absorpcję białka, tłuszczu oraz pierwiastków takich jak fosfor, wapń, żelazo;
- ❖ syntezować witaminę B₁₂ i K;
- ❖ podnosić odporność organizmu poprzez wzrost aktywności limfocytów i makrofagów;
- ❖ redukować działanie niektórych mikroorganizmów rakotwórczych.

Łatwo zauważyć, jak wiele cennych właściwości posiadają pałeczki kwasu mlekowego. Dzięki nim istnieje szereg wskazań do ich stosowania:

- ❖ leczenie antybiotykami i sterydami;
- ❖ zatrucia pokarmowe;
- ❖ doustna antykoncepcja;
- ❖ zapalenie jelit;
- ❖ nadużywanie kofeiny, alkoholu;
- ❖ picie chlorowanej i ozonowanej wody;

- ❖ zakażenia układu moczowego i płciowego, zwłaszcza mikroorganizmy *Candida albicans* (gatunek bezotoczkowego grzyba zaliczany do rzędu drożdżaków (*Saccharomycetes*), wywołujący zakażenia oportunistyczne u chorych z obniżoną odpornością).

Wymienione atrybuty kwasu mlekowego zdają się jednoznacznie przekonywać o słuszności uzupełniania diety (zwłaszcza niepełnowartościowej) preparatami, które w swoim składzie zawierają pałeczki kwasu mlekowego. Zdaje się być faktem, iż specyfik ten jest nadal niedocenianym sposobem zapobiegania negatywnym skutkom leczenia wielu schorzeń układu pokarmowego oraz innych układów. Podłożem tych wszystkich schorzeń są aberracje w składzie fizjologicznej mikroflory bakteryjnej, a podanie pałeczek *Lactobacillus acidophilus* zdaje się być nieskomplikowanym i bezpiecznym sposobem leczenia.

Kwas mlekowy był nieświadomie wykorzystywany już od bardzo dawnych czasów. W starożytności legendarna królowa Egiptu Kleopatra zażywała upiększających kąpiei w mleku, a słynęła podobno z wyjątkowo jedwabistej skóry. Wówczas jeszcze nie zdawano sobie sprawy, że jest to zasługą kwasu mlekowego, obecnego w mleku. Obecnie kwas α -hydroksypropionowy jest stosowany jako jeden z głównych składowych NMF – naturalnego czynnika nawilżającego, odpowiedzialnego za prawidłowe nawilżenie naskórka. W kosmetyce stosuje się kwas L-mlekowy, otrzymywany podczas naturalnego procesu fermentacji cukrów z udziałem bakterii mlekowych z rodzaju *Lactobacillus*. Jest on polecany ze względu na swoje właściwości i działanie do których należą m.in. :

- ❖ regulacja odnowy naskórka – poprawa kolorytu i struktury skóry;
- ❖ zwiększenie skuteczności działania innych kosmetyków;
- ❖ intensyfikacja produkcji ceramidów w skórze;
- ❖ wzrost produkcji kolagenu;
- ❖ spłycenie powierzchniowych zmarszczek;
- ❖ wybielanie przebarwień na skórze;
- ❖ działanie antybakteryjne;
- ❖ naturalny konserwant;
- ❖ regulator pH.

Kwas mlekowy znajduje coraz większe zastosowanie, jako składnik w produkcji biopolimerów. Biopolimery otrzymane z kwasu mlekowego znajdują zastosowanie:

- ❖ w medycynie, jako kompatybilne i rozkładalne implanty w osteosyntezie;
- ❖ w przemyśle włókienniczym, w produkcji odzieży, mając na celu poprawienie odporności na zanieczyszczenia i dotyk oraz elastyczność tekstyliów;
- ❖ w produkcji opakowań produktów spożywczych, napojów i artykułów biurowych;
- ❖ w przemyśle spożywczym, jako polepszacz smaku lub konserwant;
- ❖ w przemyśle garbarskim i tekstylnym, do odwapniania skór zwierzęcych oraz w procesie barwienia;
- ❖ w produkcji rozpuszczalników ekologicznych używane są estry pozyskiwane z kwasu mlekowego;
- ❖ w produkcji nawozów, do stymulowania wzrostu roślin;
- ❖ w produkcji past do zębów, jako sól wapnia.

Polimery pochodne kwasu mlekowego są przezroczyste i wykazują się dużą wytrzymałością. Rocznie produkuje się ok. 80 tysięcy ton kwasu mlekowego, z czego 90% tej ilości jest wytwarzana w procesie fermentacji. W jej wyniku, przy odpowiednim doborze szczepu bakterii, otrzymujemy jeden określony izomer kwasu α -hydroksypropionowego. Ułatwia to otrzymywanie w dalszych procesach produktu optycznie czystego. Aby otrzymać kwas α -hydroksypropionowy o najwyższej czystości potrzebne są czyste cukry. Ze względu na wysokie koszty takich substratów w procesie fermentacji jako substrat używa się skrobię. Jest to surowiec łatwy do pozyskania w dużych ilościach, a dodatkowo jest on substratem odnawialnym. Przekłada się to na stosunkowo niskie obciążenie środowiska zanieczyszczeniami [102].

4. Chemiczne procesy nieliniowe

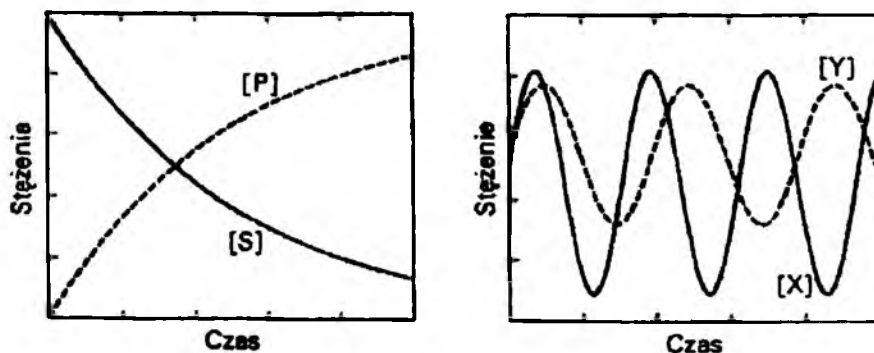
*Bóg zawarł w prawach Natury tajemną sztukę,
tak aby chaos przemienił się w doskonały system świata.*

IMMANUEL KANT

Oglądając świat w powiększeniu można dostrzec niewyobrażalną liczbę cząstek, które tańczą pod dyktando sił elementarnych. W całym Wszechświecie i w nas samych atomy oscylują, zderzają się między sobą i krążą. Stąpając po piasku stąpamy po sieci krystalicznej zbudowanej z atomów, każdy oddech wiąże się z wciągnięciem ogromnych ilości atomów tlenu, azotu i innych gazów, a w ludzkim organizmie każda komórka zмага się z wydobyciem ze związków chemicznych użytecznej energii.

Przyglądając się światu można odnieść wrażenie, iż składa się on z wielu chaotycznych struktur, dla których nie ma logicznego systemu. Złożoność jest nieodłączną cechą natury, a nie tylko skutkiem kombinacji wielu prostych procesów zachodzących na bardziej elementarnym poziomie [117]. Obserwuje się ją na wielu poziomach natury, takich jak rytuały religijne, przelotne uczucia, melodie, bagna, światowe krachy na giełdzie i deszczowe niedzielne popołudnia. Wyjaśnienie tej złożoności stanowi próbę wydobywania porządku z chaosu. To dzięki temu powstały liczne struktury oraz nieskończone piramidy wzorów, które są równie różnorodne, jak malowidła naskalne, sztuka Renesansu i abstrakcyjny ekspresjonizm. W tym całym chaosie można jednak dostrzec wskazówkę, która zdaje się być kluczem do rozwiązania tych jakże trudnych zagadek. Wskazówka ta to dynamika nieliniowa.

Każdy, kto zetknął się choćby z najprostszymi procesami chemicznymi wie, iż w miarę postępu reakcji stężenia substratów maleją, a produktów rosną.



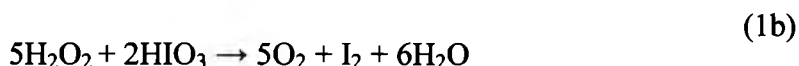
Rys. 18. Porównanie czasowych zmian stężeń: (a) substratu ([S]) i produktu ([P]) w typowej reakcji chemicznej i (b) substancji przejściowych ([X], [Y]) w reakcji oscylacyjnej [118].

Taki przebieg obserwuje się w klasycznych reakcjach, z którymi można się spotkać w codziennej praktyce laboratoryjnej. Nieco inaczej przedstawia się sprawa w przypadku reakcji oscylacyjnych. Stanowią one grupę reakcji, które są efektywnie przebiegającymi procesami, w czasie trwania których, pomimo utrzymywania niezmiennych w czasie warunków, w układzie może dojść do spontanicznych oscylacji stężeń niektórych reagentów, na przykład przemiennej dominacji ich form utlenionych i zredukowanych. W przypadku układów jednorodnych dotyczy to również substancji przejściowych pomiędzy substratami i produktami. Jeżeli formy utlenione i zredukowane mają różną barwę, zjawiska te ujawniają się jako periodyczne lub chaotyczne (z możliwym ukrytym porządkiem) zmiany barwy roztworu. Są to tak zwane reakcje oscylacyjne, gdyż stężenia substratów i produktów oscylują wokół jakiegoś poziomu [119]. Reakcje tego typu mają miejsce nie tylko w chemii czy biochemii, ale również w takich dziedzinach, jak ekologia, socjologia czy psychologia. Reakcje zachodzące w regularny, okresowy i bardzo złożony sposób stanowią wspólną cechę wielu układów odległych od stanów równowagi, a zatem takich, w których dzieją się intensywne, nieodwracalne przemiany fizyczne lub chemiczne [120]. Reakcje tego typu mają miejsce w organizmach żywych, czego przykładem może być stymulacja skurczów serca, czy też cykliczne zmiany potencjału, spowodowane wahaniami stężenia jonu K^+ na błonie komórek nerwowych. Jednak istotą całej tej układanki jest znalezienie takiego elementu, który pozwalałby na wyjaśnienie wielu zjawisk samoorganizacji w układach nieożywionych i ożywionych.

Historia procesów wykazujących niemonotoniczność przebiegu w czasie lub przestrzeni sięga XIX wieku [121]. Do najslynniejszych przykładów reakcji oscylacyjnych należą reakcja Bielousowa–Żabotyńskiego i tak zwane „pulsujące serce rtęciowe” [122,123,124].

4.2. Reakcja Bielousowa–Żabotyńskiego (reakcja B–Ż)

W roku 1921 William Bray badał stężenie jodanu(V) (IO_3^-) podczas katalitycznego rozkładu nadtlenu wodoru z zastosowaniem jodu (I_2) jako katalizatora (reakcja 1).

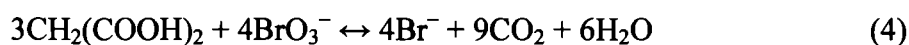


Zauważył on cykliczne zmiany stężenia katalizatora podczas zachodzenia reakcji. Wyniki jego prac zaliczono do „niemożliwych” zjawisk chemicznych, czyli do artefaktów. Dopiero Borys Pawłowicz Bielousow zbadał reakcję kwasu malonowego $\text{CH}_2(\text{COOH})_2$ z bromianem(V) potasu w obecności soli ceru. Następnie pracą nad tym zagadnieniem zajął się Anatol Żabotyński, który określił dokładne warunki, jakie muszą być spełnione, aby ta reakcja mogła przebiec [125].

Reakcja B–Ż określana jest jako grupa reakcji, polegających na utlenianiu związku organicznego bromianami(V) w obecności katalizatora, którym najczęściej są kationy metalu. Występują one na dwóch stopniach utlenienia: M^{n+} i $\text{M}^{(n+1)+}$. Podstawą reakcji jest utlenianie kationu M^{n+} do kationu $\text{M}^{(n+1)+}$, który następnie utlenia związek organiczny, a sam się redukuje do postaci pierwotnej M^{n+} . Istnieje szereg mechanizmów reakcji B–Ż, które opierają się na dwóch ogólnych etapach, w których następuje utlenienie katalizatora bromianem(V) BrO_3^- , a następnie redukcja substancji organicznej:

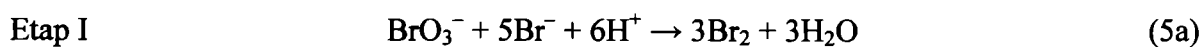


Dokładnie rzecz ujmując, problem sprowadza się do odwracalnego utleniania kwasu malonowego do dwutlenku węgla przez jony bromkowe Br^- przy udziale jonów ceru jako katalizatora:

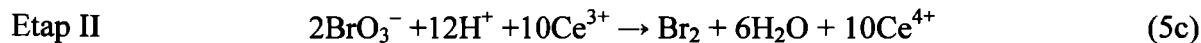


Reakcja ta jest dwuetapowa, a każdy z procesów zachodzi cyklicznie, jeden po drugim.

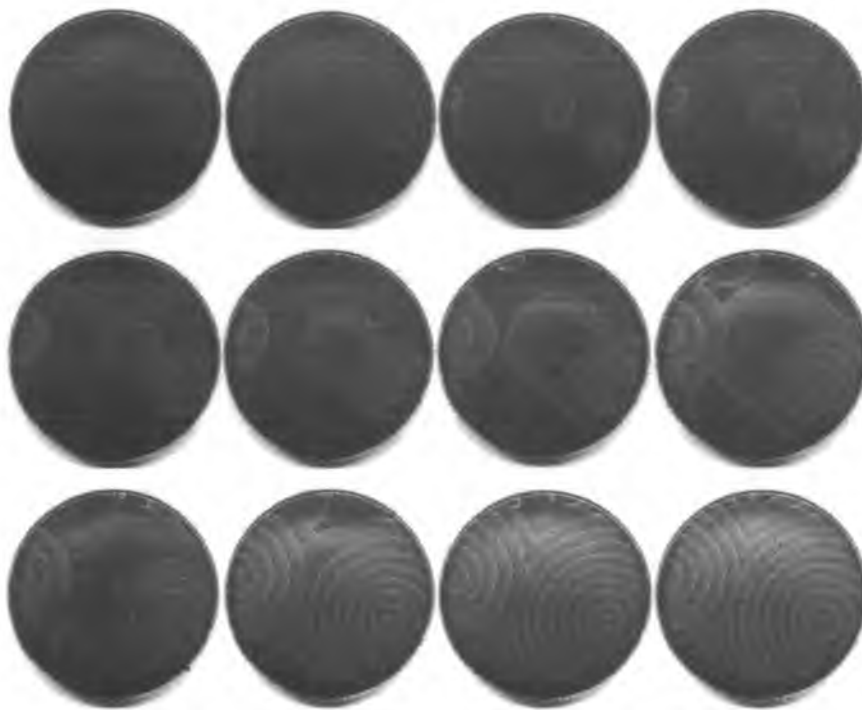
W pierwszym etapie powstający brom reaguje z kwasem malonowym.



W drugim etapie zachodzi cykliczna zmiana stężenia jonów Ce^{3+} i Ce^{4+} .

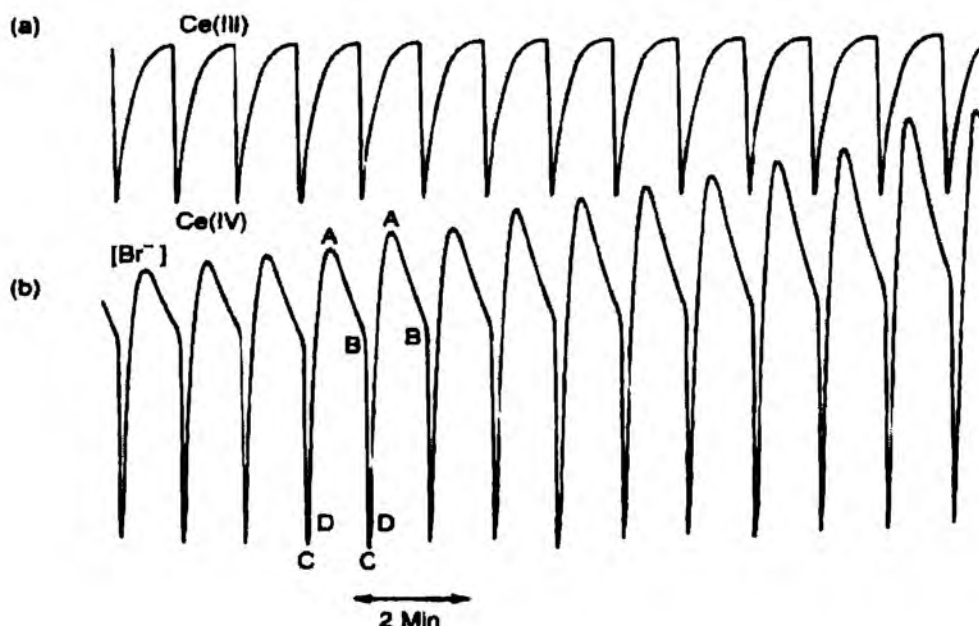


Reakcji towarzyszą zmiany zabarwienia, a istotny wpływ na nie ma cykliczna zmiana stężenia jonów Ce^{3+} oraz Ce^{4+} . Jony Ce^{3+} są bezbarwne, a jony Ce^{4+} posiadają intensywnie żółtą barwę. Wskaźnikiem używanym w reakcji jest kompleks ferroiny z atomami Fe(II) o barwie czerwonej. Jony Ce^{4+} utleniają atomy żelaza(II) do żelaza(III), które dają zabarwienie niebieskie z ferroiną. Kombinacja żółtej barwy jonów Ce^{4+} oraz niebieskiej kompleksu ferroiny z atomami żelaza(III) daje barwę zieloną. Periodyczne zmiany stężenia jonów Ce^{3+} i Ce^{4+} wynikają z faktu, iż drugi etap ma charakter autokatalityczny, a pierwszy etap zachodzi przy odpowiednio wysokim granicznym stężeniu jonów bromianowych BrO_3^- , które są generowane w etapie drugim.



Rys. 19. Fotografie kolejnych etapów rozwoju samoorganizacji w zmodyfikowanej reakcji oscylacyjnej Bielousowa–Żabotyńskiego [126]

Reakcja zaprezentowana na rysunku 19 jest modyfikacją reakcji oscylacyjnej Bielousowa–Żabotyńskiego, w której użyto większego stężenia wskaźnika – katalizatora jakim jest ferroina. Mając do czynienia z roztworem nie mieszanym bardzo szybko zauważalna jest samoorganizacja przestrzenna, która uwidacznia się w postaci wędrujących fal. Są one wynikiem zmian stopnia utlenienia reagentów: forma zredukowana – kolor pomarańczowy, forma utleniona – zabarwienie niebieskie.



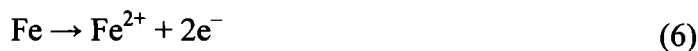
Rys.20 Wykres przedstawiający typowy wynik eksperymentalny w reakcji Bielousowa – Żabotyńskiego.

Oscylacje przedstawione są jako potencjał (a) elektrody platynowej i (b) elektrody bromkowej (obie w odniesieniu do elektrody kalomelowej) [128]

4.2. Bijące „serce” rtęciowe

Innym przykładem reakcji oscylacyjnych jest bijące „serce” rtęciowe. Pozwala ono zaobserwować oscylacyjne kurczenie i rozkurczanie się kropli rtęci.

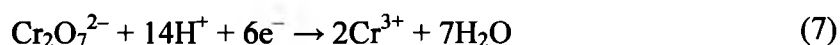
Niewielką ilość rtęci umieszcza się na szkiełku zegarkowym, na które następnie wlewa się rozcieńczony roztwór kwasu siarkowego(VI) i utleniacza, którym może być dichromian(VI) potasu lub manganian(VII) potasu, tak aby zakryły one kroplę rtęci. Następnie obok szkiełka stawia się igłę stalową lub żelazną wetkniętą w korek, w taki sposób, aby koniec igły był zanurzony w roztworze i dotykał kroplę rtęci. Powierzchnia owej kropli będzie się szybko kurczyć, a następnie rozszerzać w wyniku zachodzących reakcji elektrolitycznych, tworząc sercowaty kształt kropli. Takie drgania mogą trwać nawet ponad godzinę. Żelazna igła będzie się roztwarzać, według równania:



W momencie zetknięcia się igły z rtęcią następuje ujemne ładowanie się kropli. Kurczenie się jest efektem wizualnym i następuje na skutek zmian napięcia

powierzchniowego ciekłego metalu w zależności od zmian potencjału elektrycznego. Gdy rtęć kurczy się, kontakt z żelazem zostaje przerwany, a ładunek ujemny zostaje usunięty z roztworu

w reakcji z utleniaczem:



Spadek napięcia powierzchniowego rtęci uwidacznia się rozplaszczaniem kropli aż do ponownego jej kontaktu z metalową igłą. Stężenie kwasu siarkowego(VI) wywiera wpływ na szybkość drgań „serca”.

Cechą charakterystyczną reakcji oscylacyjnych jest to, że pewne reagenty ulegają niemonotonicznym, czyli oscylacyjnym zmianom stężenia w czasie. Analiza zjawisk zachodzących wystarczająco daleko od stanu równowagi termodynamicznej dała początek Prigogine'owskiej koncepcji struktur dyssypatywnych [127,128,129]. Ukazanie się periodycznych w czasie oscylacji stężeń czy periodycznych w przestrzeni rozkładów stężeń lub innych zmiennych termodynamicznych jest przykładem pojawienia się pewnego porządku w układach ich samoorganizacji. Periodyczność możemy zaobserwować tylko w układach, w których z dostateczną intensywnością zachodzą procesy wybitnie nieodwracalne – dyssypacje. Aby przebieg procesów fizykochemicznych mógł przybrać charakter oscylacyjny, muszą zostać spełnione następujące warunki:

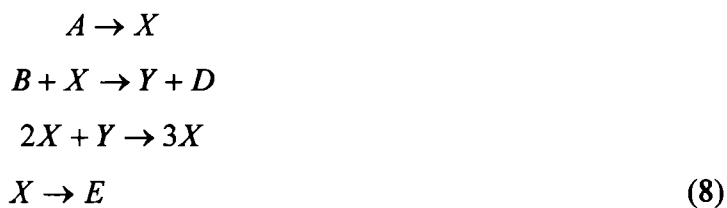
- ❖ Parametry opisujące układ muszą być odległe od stanu równowagi. Wynikiem tego jest ich duża wartość jako siły napędowej reakcji, której miarą w warunkach izotermiczno – izochorycznych lub izotermiczno – izobarycznych jest ujemna swobodna energia Helmholtza ΔF ($F = E - TS$) lub swobodna entalpia reakcji Gibbsa, ΔG ($G = H - TS$), gdzie E jest energią wewnętrzną, H – entalpią, T – temperaturą, a S – entropią.
- ❖ Musi być spełniona zasada nieliniowości charakterystyki dynamicznej układu. Równania kinetyczne reakcji muszą być nieliniowe, tzn. muszą zawierać człony, wyrażające np. iloczyn stężeń dwóch lub więcej form przejściowych, lub stężenie pojedynczej formy podniesione do potęgi różnej od jedności.

- ❖ Oczekuje się, aby w mechanizmie reakcji istniały etapy (pętle) sprzężeń zwrotnych, niekiedy o odpowiednio opóźnionym działaniu.

4.3. Brukselator

Ożywienie badań nad samoorganizacją po ukazaniu się pionierskich prac Turinga nastąpiło w niedługim czasie po symposium w Pradze w 1968 roku, podczas którego naukowcy dowiedzieli się o reakcji Biełousowa – Żabotynskiego. Spowodowało to falę badań nad reakcjami oscylacyjnymi, ale zachodzącymi w organizmach żywych (np. fotosynteza i glikoliza), które dostarczają organizmom energię [134].

Brukselator jest układem abstrakcyjnych równań chemicznych, przebiegających równolegle i opisujących pewien proces nieliniowy. Został on zaproponowany przez Prigogine'a i jasno ukazuje, jak sprzężenie zwrotne i nieliniowość prowadzą do samoorganizacji, kiedy bardzo liczne cząsteczki na pozór "komunikują się" między sobą i zachowują w bardzo złożony sposób. W brukselatorze dwa substraty, A i B, przekształcają się w produkty D i E. Zachodzą w tym czasie interesujące zjawiska nieliniowe, ponieważ proces ten składa się z czterech reakcji elementarnych i uczestniczą w nim jeszcze dwa związki, X i Y. Szczegóły nie są skomplikowane. Cząsteczka A zmienia się najpierw w X; X reaguje z B i powstaje cząsteczka Y oraz produkt D. W trzeciej reakcji dwie cząsteczki X łączą się z jedną cząsteczką Y, po czym powstają trzy cząsteczki X. Następnie X bezpośrednio przekształca się w E. Sprzężenie zwrotne, konieczne do wystąpienia samoorganizacji, pojawia się w trzeciej reakcji, gdy z dwóch cząsteczek X powstają trzy takie cząsteczki. Związek X działa zatem jak autokatalizator. Nieliniowość związana jest z tym, że na każde dwie cząsteczki biorące udział w reakcji powstaje jedna dodatkowa.



Brukselator można utrzymać w stanie dalekim od równowagi, bez przerwy dostarczając substratów. W tym celu wystarczy posłużyć się otwartym mieszalnikiem

przepływowym. Wtedy udaje się utrzymywać stężenie związków A i B na pożądanym poziomie, regulując ich dopływ. Podobnie możemy kontrolować stężenie produktów D i E. Wówczas tylko stężenie X i Y zależy od czasu. Aby zbadać ich ewolucję, musimy rozwiązać matematyczne równania, opisujące brukselator. Mają one postać układu dwóch nieliniowych równań różniczkowych, określających stężenie związków X i Y. Śledząc sposób funkcjonowania brukselatora można przekonać się, jak złożona może być ewolucja opisana dwoma równaniami. Model ten jest na tyle prosty, że rozwiązanie da się znaleźć bez pomocy komputera. Jeśli założymy, że związek X jest czerwony, a Y niebieski, wysymulujemy kolorowe struktury opisujące periodyczne zmiany przestrzenne rozkładu stężeń.

Zacznijmy od końca reakcji. Wymieszane składniki reagują ze sobą i otrzymujemy stan równowagi termodynamicznej, w której ustają wszelkie chemiczne zmiany. Obserwujemy niezbyt interesującą, fioletową „zupe”, tj. jednorodną mieszaninę cząsteczek czerwonych oraz niebieskich. Jeżeli stężenie związków A i B jest utrzymywane na poziomie bliskim równowagi, to niewiele się zmienia. Ciekawe zjawiska zaczynają się dopiero wtedy, gdy stężenie tych związków przekracza pewną wartość progową powyżej punktu równowagi. Wówczas, niezależnie od początkowego stężenia X i Y, występują oscylacje. Mieszanina zmienia kolor z czerwonego na niebieski i odwrotnie, przy czym zmiany są okresowe. Określamy to mianem niestabilności Hopfa, od nazwiska matematyka, który opisał to zjawisko.

Brukselator demonstruje, jak dzięki samoorganizacji z niezbyt obiecującej mieszaniny może się narodzić porządek. Gdy utrzymujemy układ z dala od punktu równowagi, stale dodając reagujące związki chemiczne, mieszanina w reaktorze regularnie zmienia kolor z czerwonego na niebieski i znów na czerwony. Taką oscylującą reakcję często określa się mianem zegara chemicznego, z uwagi na regularność cyklu [130]. Regularne cykle przebiegają dopóty, dopóki zapewniamy stały dopływ substratów i odpływ produktów z reaktora [131].

5. Cel pracy

Zasadniczym celem niniejszej pracy było kontynuowanie badań, wcześniej rozpoczętych w Zakładzie Chemii Ogólnej i Chromatografii ICh UŚ, a dotyczących zachodzącego *in vitro* procesu samorzutnej oscylacyjnej konwersji chiralnej wybranych kwasów karboksylowych.

Szczegółowe cele badawcze niniejszej rozprawy były następujące:

- (i) Znalezienie nowych klas chiralnych kwasów karboksylowych, które mogą ulegać samorzutnej oscylacyjnej konwersji chiralnej *in vitro*. Jako takie właśnie związki wytypowałam do prowadzonych przez siebie badań wybrane α -aminokwasy oraz α - i β -hydroksykwasy.
- (ii) Stwierdzenie, czy i w jakim stopniu długość łańcucha węglowego oraz położenie centrum asymetrii w tym łańcuchu węglowym względem grupy karboksylowej decyduje o zachodzeniu samorzutnej oscylacyjnej konwersji chiralnej *in vitro* kwasów karboksylowych. W tym celu wytypowałam do prowadzonych przez siebie badań wybrane hydroksykwasy o trzech i czterech atomach węgla w łańcuchu (pochodne kwasu propionowego i kwasu masłowego), a także o podstawniku hydroksylowym, znajdującym się przy atomach węgla α i β względem grupy karboksylowej.
- (iii) Pogłębienie dotychczasowego zrozumienia szczegółowego mechanizmu reakcji elementarnych, składających się na zachodzący *in vitro* proces samorzutnej oscylacyjnej konwersji chiralnej wybranych aminokwasów i hydroksykwasów.

6. Część doświadczalna

6.1. Odczynniki i materiały

W badaniach, będących przedmiotem niniejszej pracy, wykorzystano odczynniki chemiczne i materiały przedstawione w Tabelach 1-4.

Tabela 1. Ogólna charakterystyka badanych analitów.

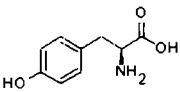
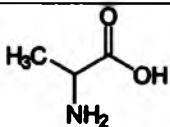
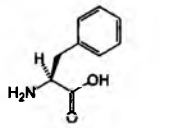
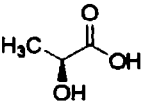
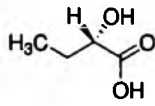
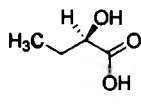
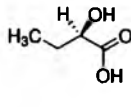
Analit	Wzór chemiczny	Skręcalność właściwa	Numer katalogowy	Stopień czystości	Producent
<i>L</i> -Tyrozyna		-10° – -12.3° [132]	K1751-5G 471909-1G	≥98%	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
<i>L</i> -Alanina		13.5° – 15.5° [132]	1.01007	≥98%	Merck, Darmstadt, Germany
<i>L</i> -α-Fenylalanina		-34° [132]	1.07256.00 25	≥99%	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Kwas <i>L</i> -(+)-mlekowy		2.6° [133]	69771	≥99%	Fluka, Buchs, Switzerland
Kwas <i>S</i> -α-hydroksymasłowy		-6.8° – 2.3° [134, 135, 136, 137]	54918	≥99%	Fluka, Buchs, Switzerland
Kwas <i>R</i> -α-hydroksymasłowy		2.5° – 6.0°	54917	≥99%;	Fluka, Buchs, Switzerland
Kwas <i>R</i> -β-hydroksymasłowy		-17.5° – -24.7° [138, 139]	54917	≥99%;	Fluka, Buchs, Switzerland

Tabela 2. Ogólna charakterystyka cieczy stosowanych jako rozpuszczalniki analitów i/lub jako fazy ruchome w chromatografii cieczowej

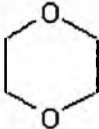
Związek chemiczny	Wzór chemiczny	Stopień czystości	Producent
Acetonitryl	CH_3CN	$\geq 99,9\%$	Merck, Darmstadt, Niemcy
Metanol	CH_3OH	$\geq 99,8\%$	Merck, Darmstadt, Niemcy
Etanol	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	$\geq 99,9\%$	Merck, Darmstadt, Niemcy
n-Butanol	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{OH}$	$\geq 99,9\%$	Fluka, Buchs, Szwajcaria
Dioksan		$\geq 99,8\%$	Merck, Darmstadt, Niemcy
Woda	H_2O	redestylowana	Laboratorium Uniwersytetu Śląskiego, Katowice, Polska
Lodowaty kwas octowy	CH_3COOH	$\geq 99,5\%$	POCH, Gliwice, Polska
Roztwór buforowy, pH=9	H_3BO_3 , KCl, NaOH	$\pm 0,05$ (20°C)	POCH, Gliwice, Polska
Zdeuterowany dichlorometan	CDCl_3	$\geq 99,8\%$	Armar Chemicals, Döttingen, Szwajcaria
2-Propanol	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	$\geq 99,8\%$	Merck, Darmstadt, Niemcy

Tabela 3. Ogólna charakterystyka substancji pomocniczych stosowanych w przeprowadzonych badaniach.

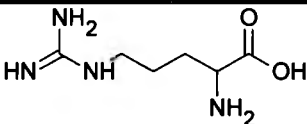
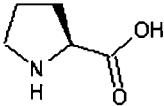
Związek chemiczny	Wzór chemiczny	Stopień czystości	Producent
<i>L</i> -Arginina		≥99%	Merck, Darmstadt, Niemcy
<i>L</i> -Prolina		≥99%	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Pięciowodny siarczan(IV) miedzi(II)	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	≥98%	POCH, Gliwice, Polska
Dwuwodny octan miedzi(II)	$\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$	≥99%	POCH, Gliwice, Polska
Wodorotlenek sodu	NaOH	≥98%	POCH, Gliwice, Polska
Kwas chlorowodorowy	HCl	≥98%	POCH, Gliwice, Polska

Tabela 4. Podstawowa charakterystyka materiałów stosowanych jako fazy stacjonarne w chromatografii cieczowej.

Faza stacjonarna	Rodzaj chromatografii	Numer katalogowy	Wymiary kolumny i średnica ziarna	Producent
Żel krzemionkowy 60 F ₂₅₄ (gotowe płytki szklane)	TLC	1.05715	-	Merck, Darmstadt, Niemcy
Kolumna chromatograficzna Pursuit 5 C18	HPLC	A3000250 C046	250 mm × 4,6 mm 5 μm	Varian, Harbor City, CA, USA
Kolumna chromatograficzna Pursuit X R _S 3-C18	HPLC	A6001050 C020	50 mm × 2,0 mm 5 μm	Varian, Harbor City, CA, USA

6.2. Sprzęt i aparatura

Poniżej przedstawiono wykaz sprzętu użytego podczas przeprowadzonych w niniejszej pracy badań wybranymi technikami analitycznymi:

- Densytometr CD 60 firmy Desaga (Heidelberg, Niemcy), wyposażony w program ProQuant firmy Desaga, współpracujący z systemem Windows.
- Automatyczny aplikator próbek do płytek chromatograficznych (model AS-30) produkcji firmy Desaga (Heidelberg, Niemcy);
- Chromatograf HPLC firmy GynkoteK (Germering, Niemcy):
 - Autosampler: GynkoteK Gina 50;
 - Pompa: GynkoteK typ P 580A LPG;
 - Detektor: GynkoteK DAD UVD 340U;
 - Program do akwizycji i obróbki danych: Chromeleon.Dionex wersja 6.40;
 - Termostat: Varian Pro Star 510;
- Chromatograf HPLC model 920 firmy Varian (Harbor City, CA, USA):
 - Autosampler;
 - Pompa gradientowa;
 - Detektor z matrycą fotodiodową (DAD);
 - Program do akwizycji i obróbki danych: Galaxie;
- Chromatograf LC-MS firmy Varian (Palo Alto, CA, USA):
 - Pompa: Varian ProStar;
 - Detektor: Spektrometr masowy Varian 500-MS-ESI;
 - Program do akwizycji i obróbki danych: Varian MS Workstation wersja 6.9.1;
- Polarymetr Polamat A firmy Carl Zeiss (Jena, Niemcy);
- Polarymetr 341 firmy Perkin-Elmer (Wellesley, MA, USA);
- Spektrometr NMR 400 Hz firmy Bruker Avance (Billerica, USA);
- Video densytometr Chromimage firmy AR2i (Le Plessis Robinson, Francja);
- Komora chromatograficzna wg Stahla, produkcji firmy Camag (Muttenez, Szwajcaria);
- Waga laboratoryjna Scaltec (model SBC 31) produkcji firmy Scaltec Instruments (Heiligenstadt, Niemcy);
- Kalibrowane kapilary do nanoszenia próbek stosowane w chromatografii cienkowarstwowej produkcji firmy Camag (Muttenez, Szwajcaria);

- Drobny sprzęt laboratoryjny (kolby miarowe, pipety, szkiełka mikroskopowe, termometr).

6.3. Metodyka prowadzonych badań

6.3.1. Technika chromatografii cienkowarstwowej (TLC)

W przeprowadzonych eksperymentach zastosowano różne układy chromatograficzne dla poszczególnych analitów, tj. *L*-tyrozyny, *L*-alaniny, *L*- α -fenyloalaniny, kwas *L*-mlekowy, kwas *S*- α -hydroksymasłowy i *R*- α -hydroksymasłowy, kwas *R*- β -hydroksymasłowy chromatografowanych pojedynczo. Tabela 5 przedstawia ogólną charakterystykę zastosowanych układów chromatograficznych. Do badań użyto czystych optycznie antymerów poszczególnych związków. Jako racemat zastosowano do badań kwasy α -hydroksymasłowe.

Przed przystąpieniem do nanoszenia analitów, płytki chromatograficzne przygotowywano poprzez ich przedwstępne rozwijanie w roztworze zawierającym metanol i wodę w stosunku objętościowym 9:1. Następnie płytki suszono w temperaturze pokojowej przez okres 3 godzin. Przedwstępne rozwijanie płytek miało na celu usunięcie z powierzchni żelu krzemionkowego ewentualnych zaadsorbowanych na etapach produkcji i przechowywania zanieczyszczeń, a przez to zwiększenie czułości rozdziału. Tak oczyszczone i wysuszone płytki poddawano następnie impregnacji. W przypadku tyrozyny, alaniny oraz fenyloalaniny płytki zanurzano na około 2 sekundy w siarczan(VI) miedzi(II) o stężeniu $5,01 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$, a następnie wygrzewano je przez 10 minut w suszarce w temperaturze 110°C . Po ostygnięciu jeszcze raz zanurzano je na 2 sekundy, tym razem w metanolowo-wodnym (9:1, v/v) roztworze *L*-proliny o stężeniu $3,04 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$. Dla kwasu mlekowego, *R*- i *S*- α -hydroksymasłowego oraz *R*- β -hydroksymasłowego jako impregnatu użyto wodnego roztworu octanu miedzi(II) o stężeniu $5,01 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$.

Rozwijanie chromatogramów w wariacie jednokierunkowym było stosowane dla *L*-tyrozyny, *L*-alaniny, *L*- α -fenyloalaniny, kwasu *L*-mlekowego oraz kwasu *R*- β -hydroksymasłowego, natomiast wariantu dwukierunkowego użyto w przypadku kwasu *R*- i *S*- α -hydroksymasłowego.

W wariacie jednokierunkowego rozwijania chromatogramów badane anality (o określonej objętości roztworów) nanoszono na płytki chromatograficzne ręcznie (przy pomocy mikrokapilar), lub przy pomocy automatycznego aplikatora. Następnie chromatogramy rozwijano w komorze wg Stahla (po uprzednim nasyceniu jej przez okres 30 minut parami fazy ruchomej). W przypadku alaniny długość drogi migracji fazy ruchomej wynosiła 100 mm, fenyloalaniny, tyrozyny, kwasu mlekowego 150 mm, natomiast dla kwasu

R- i *S*- α -hydroksymasłowego oraz kwasu *R*- β -hydroksymasłowego ta długość wynosiła 85 mm. Po rozwinięciu chromatogramy suszono, a następnie densytometrowano. W trakcie analizy mierzono czas rozwijania chromatogramu i temperaturę otoczenia. Badane anality przechowywano w temperaturze $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ i chromatografowano je jeden raz dziennie przez okres do jednego miesiąca (z wyłączeniem dni wolnych od pracy). Każdy eksperyment był powtarzany co najmniej trzykrotnie.

W wariancie dwukierunkowego rozwijania chromatogramów badany analit наносono na płytki chromatograficzne ręcznie (przy pomocy mikrokapilar), lub przy pomocy automatycznego aplikatora w postaci pojedynczej plamki w jednym z narożników płytki chromatograficznej. Następnie chromatogram rozwijano w wariancie jednokierunkowym w komorze wg Stahla (po uprzednim nasyceniu jej przez okres 30 minut parami fazy ruchomej). Długość drogi migracji fazy ruchomej wynosiła dla *R*- i *S*- α -hydroksymasłowego wynosiła 85 mm. Po rozwinięciu chromatogram suszono, a następnie densytometrowano, po czym rozwijano chromatogram w drugim kierunku, prostopadłym do rozwijania jednokierunkowego, w komorze wg Stahla, w tej samej fazie ruchomej, stosując tę samą długość drogi migracji fazy ruchomej. Analogicznie po rozwinięciu chromatogram suszono, a następnie skanowano densytometrycznie na szerokości 30 mm w odstępach 1 mm między poszczególnymi skanami. Każdy eksperyment był powtarzany co najmniej pięciokrotnie.

Skanowanie densytometryczne prowadzono przy użyciu lampy deuterowej o wymiarze prostokątnej wiązki światła wynoszącym $2,0\text{ mm} \times 0,1\text{ mm}$.

Tabela 6. Stosowane układy i warunki prowadzenia eksperymentów z zastosowaniem polarymetrii.

Analit	Rozpuszczalnik analitu	Stężenie molowe analitu [mol dm ⁻³]	Faza stacjonarna	Skład fazy ruchomej (v/v)	Objętość nanoszonej próbki [μl]	Długość fali stosowana podczas densymetrowania [nm]
L-Tyrozyna	EtOH-1M HCl (7:3, v/v)	5,5 × 10 ⁻³	żel krzemionkowy impregnowany solą miedzi(II) i L-arginina	n-butanol-acetonitryl-woda (6:2:3)	5	200
	EtOH -1M NaOH (7:3, v/v)					
L-Alanina	EtOH-H ₂ O (7:3, v/v)	5,61 × 10 ⁻²		2-propanol-acetonitryl-woda (6:2:3)	5	540
	EtOH-1M HCl (7:3, v/v)					
	EtOH -1M NaOH (7:3, v/v)					
L-α-Fenylalanina	EtOH-H ₂ O (7:3, v/v)	6,1 × 10 ⁻³		n-butanol-acetonitryl-woda (6:2:3)	5	200
	EtOH-1M HCl (7:3, v/v)					
	EtOH -1M NaOH (7:3, v/v)					
Kwas L-mlekowy	EtOH-H ₂ O (7:3, v/v)	5,55 × 10 ⁻¹	żel krzemionkowy impregnowany solą miedzi(II)	dioxan-woda (9:1)	5	254 315
	EtOH-CH ₃ COOH (7:3, v/v)					
	EtOH-bufor zasadowy (7:3, v/v)					
Kwas S-α-hydroksymasłowy	EtOH-H ₂ O (7:3, v/v)	4.8 × 10 ⁻¹		dioxan-woda (9:1)	3	326
Kwas R-α-hydroksymasłowy	EtOH-H ₂ O (7:3, v/v)	4.8 × 10 ⁻¹		dioxan-woda (9:1)	3	326
	EtOH-H ₂ O (7:3, v/v)					
Kwas R-β-hydroksymasłowy	EtOH-H ₂ O (7:3, v/v)	4.8 × 10 ⁻¹		dioxan-woda (9:1)	3	326

6.3.2. Technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją na matrycy fotodiodowej i rozproszenia światła (HPLC-DAD i ELSD)

W ramach przeprowadzonych badań zastosowano technikę HPLC z detekcją DAD i ELSD do analizy roztworu kwasu *L*-mlekowego. W tym celu wykorzystano chromatografy cieczowe firm Gyncoetek i Varian, opisane w Rozdz. 6.2. Tabela 7 przedstawia charakterystykę badanych układów i warunków chromatografowania.

Tabela 6. Układy chromatograficzne HPLC stosowane dla poszczególnych analitów.

Analit	Rozpuszczalnik analiu	Faza stacjonarna	Skład fazy ruchomej (v/v)	Stężenie molowe analitu [mol dm ⁻³]	Prędkość przepływu fazy ruchomej [ml min ⁻¹]	Temperatura pracy kolumny [°C] ([K])	Objętość próbki [μl]
Kwas <i>L</i> -mlekowy	acetonitryl	RP-18	metanol-woda (5:5)	$2,22 \times 10^{-2}$	0,5	30 (303)	20
	70 % etanol						

Roztwór kwasu *L*-mlekowego w acetonitrylu był chromatografowany przez okres 980min a w 70% EtOH 400 min od chwili jego sporządzenia.

6.3.3. Technika wysokosprawnej chromatografii ciekowej ze spektrometrią mas (HPLC-MS)

Techniki HPLC sprzężonej z spektrometrem MS użyto do badań roztworu kwasu *L*-mlekowego. Do analizy roztworu zastosowano system LC-MS składający się z chromatografu ciekowego i spektrometru masowego firmy Varian, opisanych w Rozdz. 6.2. Roztwór ten był chromatografowany przez okres 900 minut po rozpuszczeniu próbki w acetonitryl oraz 400 minut po rozpuszczeniu próbki w 70 % etanolu. Faza stacjonarna była typu 3-C 18, natomiast faza ruchoma składała się z metanolu i wody (5:5, v/v), a jej przepływ był równy 0,2 ml min⁻¹. Objętość wprowadzanej na kolumnę próbki wynosiła 20 µl. Temperatura pracy kolumny wynosiła 30°C (303 K). Detekcja w spektrometrze masowym z systemem ESI była prowadzona w następujących warunkach:

- jonizacja pozytywna,
- temperatura komory rozpylania 45°C,
- temperatura gazu 150°C,
- ciśnienie gazu 25 psi,
- napięcie na kapilarze 70 V,
- napięcie na igle 5 kV.

6.3.4. Technika spektroskopii ¹³C NMR

Do przeprowadzenia badań techniką spektroskopii ¹³C NMR dla kwasu *L*-mlekowego zastosowano spektrometr NMR opisany w Rozdz. 6.2. Do rejestracji widm użyto świeżo sporządzonego i przechowywanego przez okres 10 dni roztworu etanolowo-wodnego (7:3, v/v). Z roztworu odparowano rozpuszczalnik, a następnie suchą pozostałość rozpuszczono w deuterowanym chloroformie (CDCl₃), a następnie zarejestrowano widmo ¹³C NMR. Aby otrzymać widmo o odpowiednim stosunku sygnału do szumu wykonano 7000 skanów z opóźnieniem (D1) wynoszącym 8 sekund.

6.3.5. Pomiary polarymetryczne

Zastosowanie polarymetrii pozwoliło uzyskać informacje na temat zmian skręcalności właściwej roztworów badanych analitów, tj. *L*-tyrozyny, *L*-alaniny, *L*- α -fenyloalaniny, kwasu *L*-mlekowego, kwasu *S*- α -hydroksymasłowego i *R*- α -hydroksymasłowego oraz kwasu *R*- β -hydroksymasłowego, w czasie ich przechowywania. Pomiary prowadzono w sposób nieciągły z zastosowaniem polarymetru firmy Carl-Zeiss i w sposób ciągły przy użyciu polarymetru firmy Perkin-Elmer (oba zostały opisane w Rozdz. 6.2). W obu przypadkach długość fali wynosiła 589 nm, co odpowiada linii D sodu. Długości użytych celek polarymetrycznych wynosiły 1 dm, a objętości badanych roztworów 1ml. Skręcalność właściwą $[\alpha]_D$ badanych próbek obliczono ze wzoru:

$$[\alpha]_D = \frac{100\alpha}{cd}$$

gdzie: α oznacza zmierzony kąt skręcenia, c to stężenie próbki w gramach przypadające na 100 ml roztworu, a d to długość drogi optycznej.

Krok czasowy przy rejestracji nieciągłej wynosił 15 minut, a dla rejestracji ciągłej wynosił 30 milisekund.

Tabela 7 przedstawia charakterystykę stosowanych układów i warunków prowadzenia eksperymentów z zastosowaniem polarymetrii.

Tabela 7. Stosowane układy i warunki prowadzenia eksperymentów z zastosowaniem polarymetrii.

Analit	Rozpuszczalnik analitu	Stężenie molowe analitu [mol dm ⁻³]	Temperatura badanego roztworu [°C]	Użycie ultradźwięków do mieszania roztworów	Okres prowadzenia pomiarów w systemie nieciągłym	Okres prowadzenia pomiarów w systemie ciągłym
<i>L</i> -Tyrozyna	EtOH-1M HCl (7:3, v/v)	$2,76 \times 10^{-1}$	22±1; 9±1	Tak	360 min	brak
	EtOH -1M NaOH (7:3, v/v)		22±1; 9±1			
<i>L</i> -Alanina	EtOH-H ₂ O (7:3, v/v)	$5,61 \times 10^{-2}$	22±1; 9±1	Tak	360 min	brak
	EtOH-1M HCl (7:3, v/v)		22±1; 9±1	Tak		
	EtOH -1M NaOH (7:3, v/v)		22±1; 9±1	Tak		
	EtOH-H ₂ O (7:3, v/v)		22±1; 9±1	Tak		
<i>L</i> -α-Fenylalanina	EtOH-H ₂ O (7:3, v/v)	$3,03 \times 10^{-2}$	22±1; 9±1	tak	240 min	280 min
	EtOH-1M HCl (7:3, v/v)					brak
	EtOH -1M NaOH (7:3, v/v)					brak
Kwas <i>L</i> -mlekowy	EtOH-H ₂ O (7:3, v/v)	$5,55 \times 10^{-13}$	22±1; 9±1	Tak	32 dni	270 min
	EtOH-CH ₃ COOH (7:3, v/v)		22±1; 9±1		5 h	brak
	EtOH-bufor zasadowy (7:3, v/v)		22±1; 9±1		5 h	brak
Kwas <i>S</i> -α-hydroksymasłowy	EtOH-H ₂ O (7:3, v/v)	$4,8 \times 10^{-1}$	22±1; 9±1	Nie	200 h	300 h
Kwas <i>R</i> -α-hydroksymasłowy	EtOH-H ₂ O (7:3, v/v)	$4,8 \times 10^{-1}$	22±1; 9±1	Nie	200 h	300 h
Kwas <i>R</i> -β-hydroksymasłowy	EtOH-H ₂ O (7:3, v/v)	$8,93 \times 10^{-2}$	22±1	Nie	brak	331 h

7. Wyniki badań i ich omówienie

7.1. Oscylacyjne zmiany wartości współczynnika retardacji (R_F) oraz skręcalności właściwej *L*-tyrozyny

7.1.1. Chiralna chromatografia cienkowarstwowa

Celem przeprowadzonych badań było eksperymentalne stwierdzenie, czy *L*-tyrozyna ulega oscylacyjnej inwersji chiralnej zgodnie z równaniem:

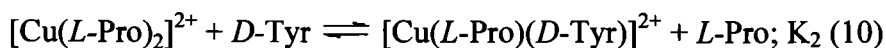
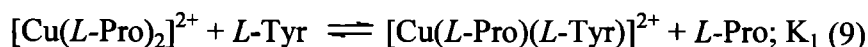


Rozdział chromatograficzny enancjomerów tyrozyny prowadzono rozwijając chromatogramy próbek tyrozyny rozpuszczonej w następujących rozpuszczalnikach:

- ❖ etanol – 1M kwas chlorowodorowy (HCl) w stosunku objętościowym 7:3 (v/v),
- ❖ etanol – 1M wodorotlenek sodu (NaOH) w stosunku objętościowym 7:3 (v/v).

Rozpuszczalność *L*-tyrozyny w rozpuszczalniku etanolowo – wodnym okazała się zbyt niska i dlatego nie użyto go w tych badaniach. Stężenie *L*-tyrozyny w każdym z badanych roztworów wynosiło 1 mg/ml. Tak przygotowane roztwory były przechowywane przez okres ośmiu dni w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Przechowywanie próbek *L*-tyrozyny w dwóch rodzajach roztworów miało na celu sprawdzenie, czy i jak środowisko wpływa na ewentualne zajście reakcji konwersji chiralnej. Roztwory nanoszono na uprzednio przygotowane płytki chromatograficzne impregnowane wodnym roztworem siarczanu(VI) miedzi(II), a następnie roztworem *L*-proliny. Faza ruchoma składała się z *n*-butanolu, acetonitrylu i wody w stosunku objętościowym 6:2:3 (v/v/v).

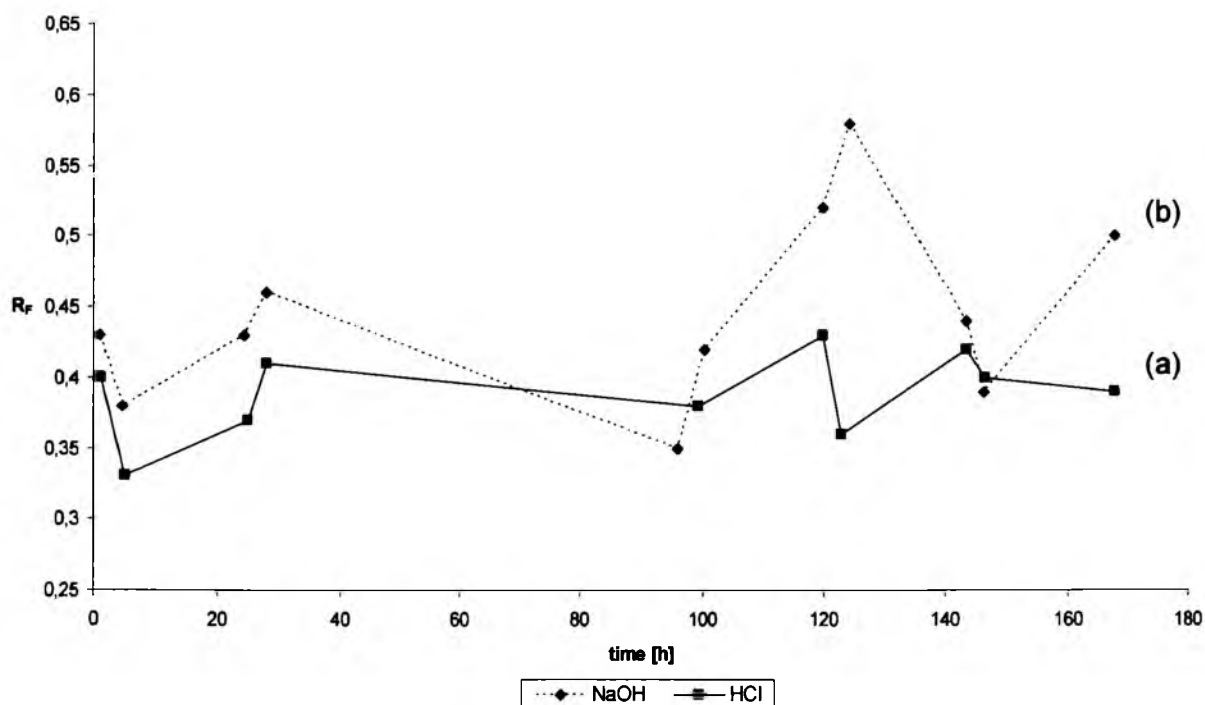
Prawdopodobny mechanizm rozdziału enancjomerów *D*- i *L*-tyrozyny można przedstawić następującymi równaniami:



Powyższy mechanizm jest znany jako chromatograficzna wymiana ligandów lub chromatografia kompleksowania. Procedurę chromatograficzną zastosowaną w tych

badaniach zaczerpnięto z badań prowadzonych przez Bhushana i jego zespół [140]. Dokonano w niej jednak modyfikacji, która polegała na zastąpieniu ręcznie powlekanych żelazem krzemionkowym płytek chromatograficznych płytkami komercyjnymi pokrytymi żelazem krzemionkowym 60 F₂₅₄.

Rysunek 21 przedstawia oscylacyjne zmiany współczynnika opóźnienia (R_F) *L*-tyrozyny rozpuszczonej w dwóch różnych rozpuszczalnikach. Obserwowane oscylacje najprawdopodobniej odzwierciedlają strukturalną konwersję *L*-tyrozyny w jej antymer *D*, gdyż zastosowane warunki przechowywania próbek nie powodowały jej rozkładu. Błąd eksperymentalny dla wartości R_F w przypadku związków nie ulegających konwersji chiralnej nie przekracza 0,02 bezwymiarowej jednostki R_F . W przeprowadzonym eksperymencie wartości współczynnika R_F tyrozyny oscylowały w przedziale od 0.35 ± 0.02 do 0.56 ± 0.02 .

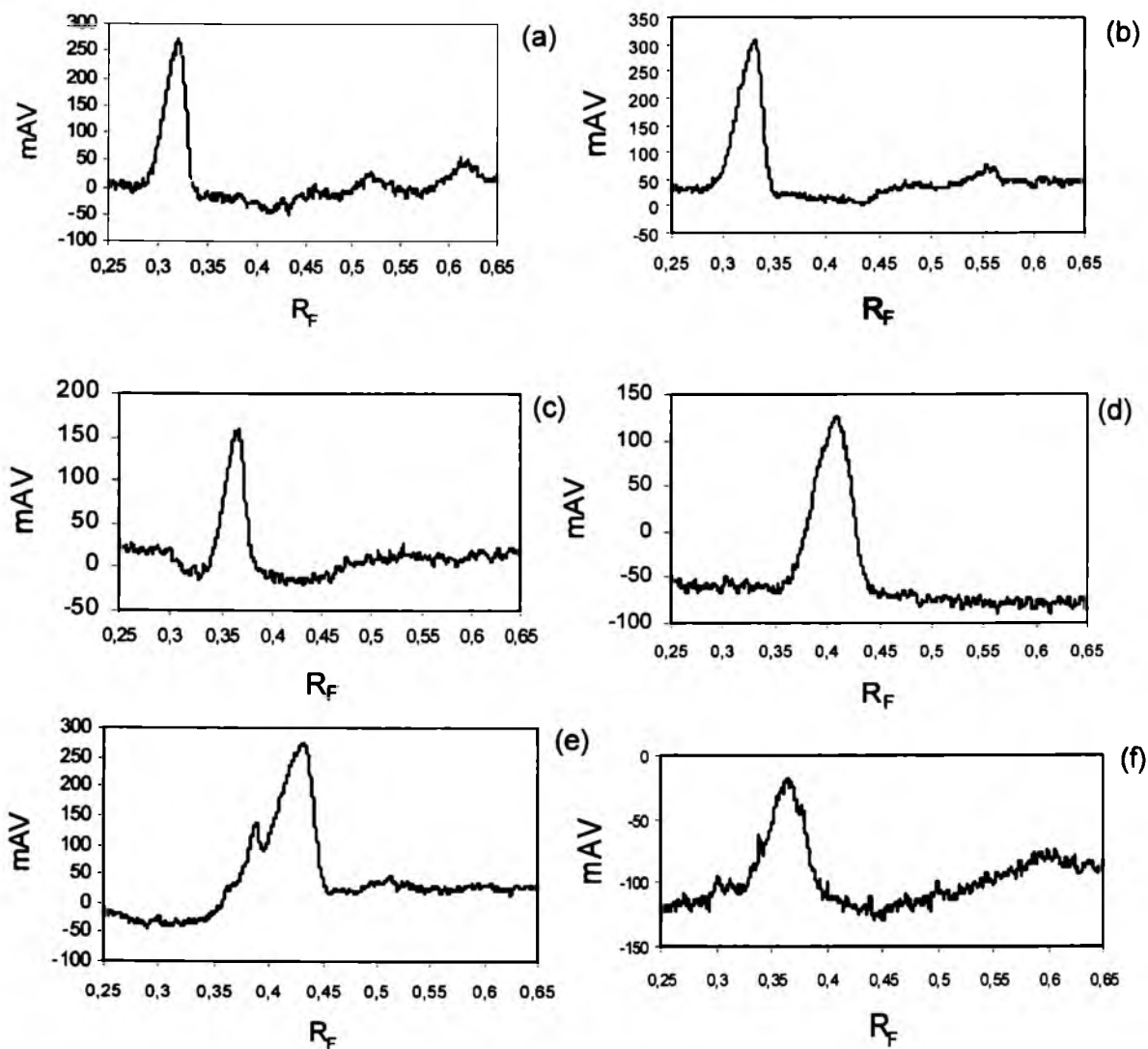


Rys.21. Zależność wartości współczynnika retardacji (R_F) od czasu przechowywania próbek w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ dla *L*-tyrozyny rozpuszczonej odpowiednio w rozpuszczalnikach (a) etanol – 1M kwas chlorowodorowy, 7:3 (v/v) i (b) etanol – wodorotlenek sodu 7:3 (v/v).

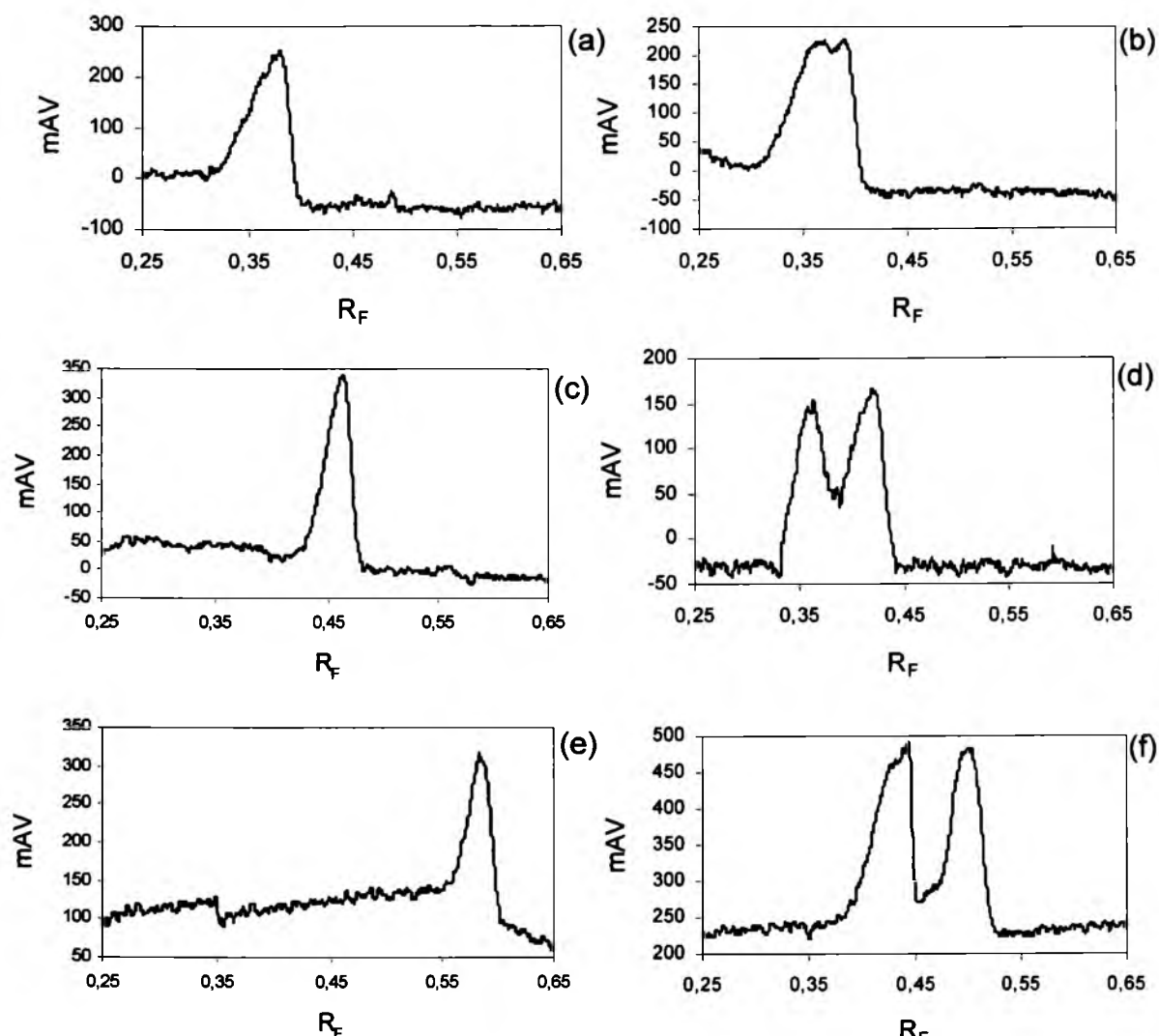
Z wyników otrzymanych w trakcie tego eksperymentu widać, iż amplitudy wartości współczynnika R_F dla tyrozyny rozpuszczonej w mieszaninie etanolu i 1M HCl są znacznie niższe, niż w przypadku tyrozyny rozpuszczonej w mieszaninie etanolu i 1M NaOH. Przypisanie wyższych wartości współczynnika R_F dla *L*-tyrozyny, a niższych dla jej antymeru *D* (zgodnie z badaniami przeprowadzonymi przez Bhushana) sugeruje, iż w przypadku *L*-

tyrozyny rozpuszczonej w mieszaninie etanol – 1M HCl, środowisko kwaśne silniej katalizuje je proces transeenantjomeryzacji, aniżeli środowisko zasadowe. Takie stwierdzenie wydaje się nieprawidłowe w świetle podstawowej wiedzy dotyczącej mechanizmów reakcji w chemii organicznej, uprzednio prowadzonych badań a także wyników otrzymanych z pomiarów polarymetrycznych. Istnieją dwa alternatywne wyjaśnienia takiego zjawiska: (i) przypisanie niższych wartości współczynnika R_F enancjomerowi *D*, a wyższych jego antymerowi *L* przez Bhushana było błędne lub (ii) w zastosowanym układzie chromatograficznym *L*-tyrozyna rozpuszczona w kwasie solnym rzeczywiście ulega szybkiej konwersji chiralnej do antymeru *D*. W świetle wyników, które zostaną przedstawione w dalszej części niniejszego podrozdziału wydaje się, iż wyjaśnienie (ii) jest bardziej prawdopodobne.

Ważnym dowodem na to, iż proces oscylacyjnej inwersji chiralnej *L*-tyrozyny skutecznie zachodzi w środowisku reakcji jest nie tylko oscylacyjna zmiana pozycji maksimów profili stężeniowych analitu na skali wartości R_F , lecz także zmiany kształtów tychże profili. Zmiany pozycji maksimów profili stężeniowych i ich kształtów zostały przedstawione na rysunkach 22a-f jako sekwencja kolejnych „stop-klatek” dla analitu rozpuszczonego w rozpuszczalniku etanol – 1M HCl i na rysunkach 23a-f dla analitu rozpuszczonego w rozpuszczalniku etanol – 1M NaOH. Obie próbki były przechowywane w odpowiednich warunkach przez okres ośmiu dni.



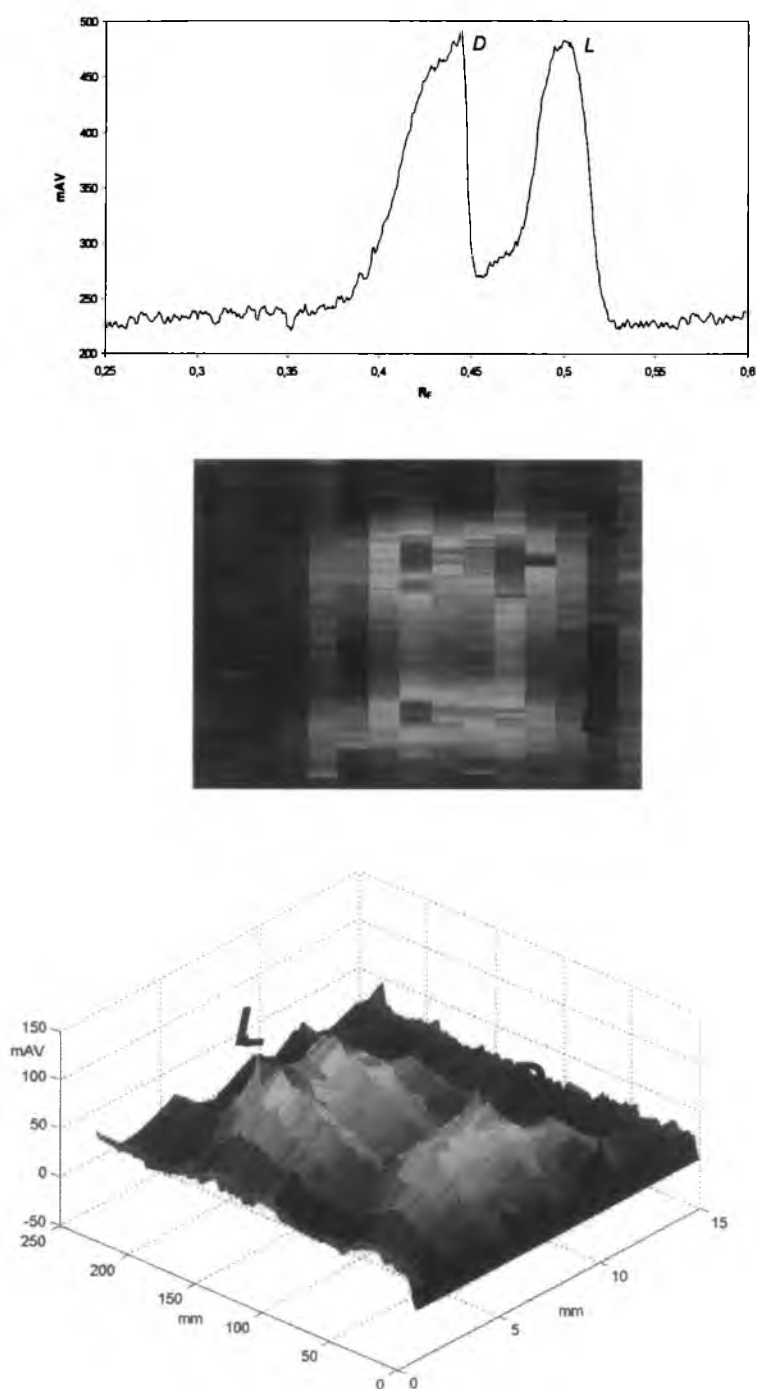
Rys.22. Sekwencja sześciu wykresów przedstawiających profile stężeniowe dla roztworu *L*-tyrozyny rozpuszczonej w mieszaninie etanol–1M HCl w stosunku objętościowym 7: 3 (v/v) po upływie (a) 1.3 h, (b) 5 h, (c) 25 h, (d) 28 h, (e) 120 h, i (f) 123 h przechowywania w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$.



Rys.23. Sekwencja sześciu wykresów przedstawiających profile stężeniowe dla roztworu *L*-tyrozyny rozpuszczonej w mieszaninie etanol–1M NaOH w stosunku objętościowym 7: 3 (v/v) po upływie (a) 1 h, (b) 4.6 h, (c) 28 h, (d) 100.5 h, (e) 124.5 h, i (f) 168 h przechowywania w temperaturze $22\pm 1^{\circ}\text{C}$.

W przypadku *L*-tyrozyny rozpuszczonej w mieszaninie etanolu i kwasu solnego otrzymane „stop-klatki” pokazują, iż przedział zmian wartości liczbowych R_F jest stosunkowo wąski, a rozdział enancjomerów tyrozyny praktycznie nie występuje przez okres ośmiu dni trwania eksperymentu. Przedział wartości liczbowych R_F w przypadku *L*-tyrozyny rozpuszczonej w mieszaninie etanolu i wodorotlenku sodu jest znacznie szerszy, a porównywalne proporcje ilościowe pomiędzy dwoma antymerami tyrozyny występują tu znacznie częściej, co można zaobserwować w postaci częstszych rozdziałów enancjomerów tyrozyny (np. rysunki 23d i 23f). Rysunek 23d przedstawia rozdział enancjomerów próbki tyrozyny przechowywanej przez okres 100.5 h, a rysunek 23f przedstawia analogiczny

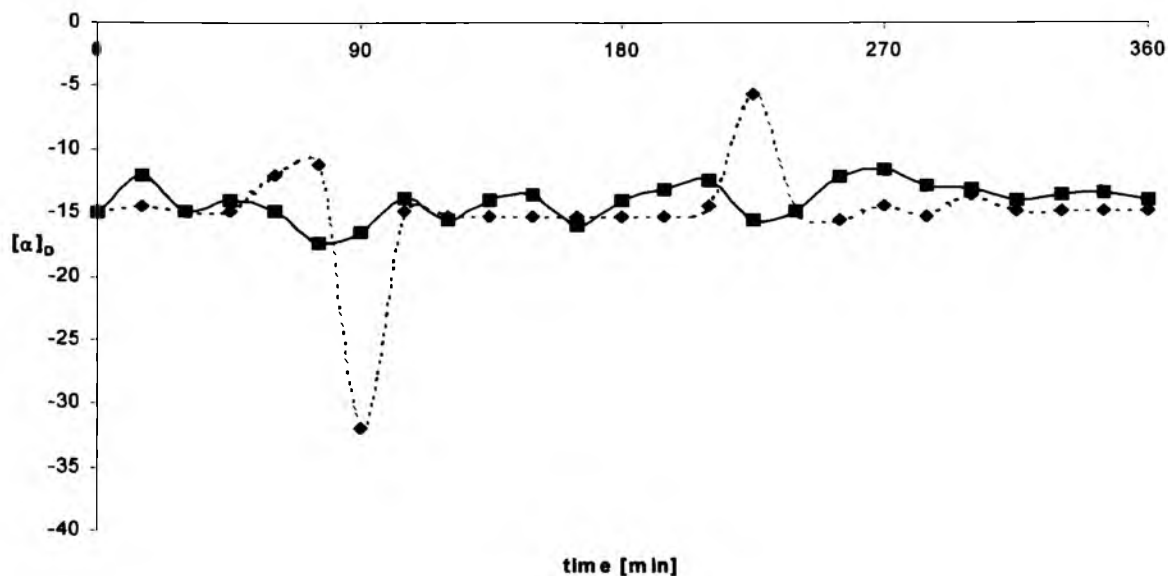
przykład niepełnego rozdziału próbki *L*-tyrozyny rozpuszczonej w rozpuszczalniku etanolowo - wodnym do jej antymeru *D*, która była przechowywana przez okres 171h.



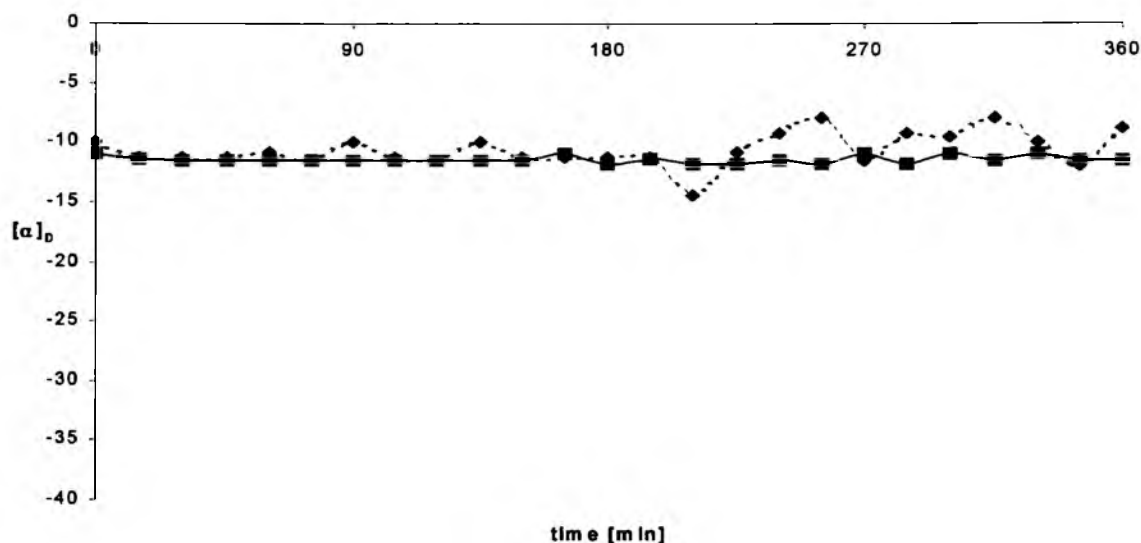
Rys.24. Densytogram (a), wideoskan (b) i chromatogram 3D (c) ilustrujące rozdział enancjomerów *L*- i *D*-tyrozyny po upływie 171 h przechowywania analitu w układzie etanol – 1M NaOH w temperaturze $22\pm 1^{\circ}\text{C}$. Rysunki (b) i (c) skonstruowano ze skanów densytometrycznych, rejestrowanych wzdłuż kierunku rozwijania chromatogramu w odstępach 1 mm.

7.1.2. Polarymetria

Badania zmian skręcalności właściwej *L*-tyrozyny były przeprowadzone w dwóch seriach doświadczeń. W pierwszej serii doświadczeń zmiany skręcalności właściwej *L*-tyrozyny w roztworze etanol – 1M kwas chlorowodorowy oraz w roztworze etanol – 1M wodorotlenek sodu były prowadzone w sposób nieciągły w temperaturze $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ przez okres 360 minut, a w drugim doświadczeniu w temperaturze $9\pm 1^{\circ}\text{C}$, również przez okres 360 minut. W obu temperaturach przeprowadzano dwa równoległe pomiary: jeden dla roztworu poddawanego działaniu ultradźwięków, a drugi dla roztworu nie poddawanego temu działaniu. Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunkach 25 i 26.

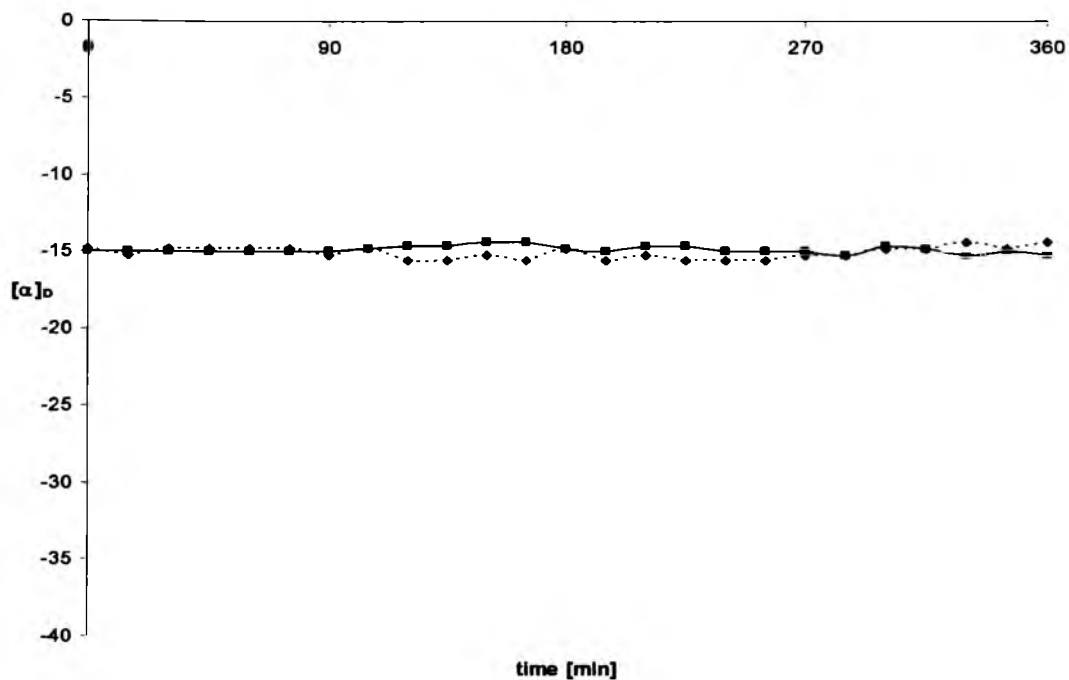


a)

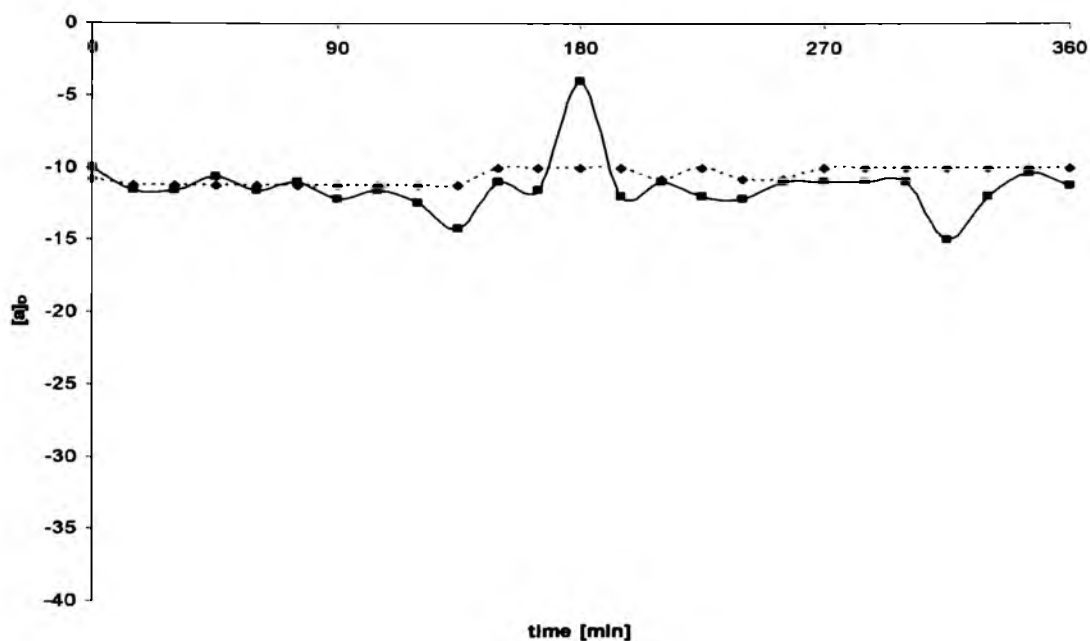


b)

Rys.25. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla roztworów *L*-tyrozyny rozpuszczonej i przechowywanej przez okres 360 minut w temperaturze $9 \pm 1^\circ\text{C}$ w rozpuszczalnikach (a) etanol – 1M wodorotlenek sodu (7:3, v/v) i (b) etanol – 1M kwas solny (7:3, v/v). Wyniki dla roztworów poddawanych działaniu ultradźwięków i nie poddawanych temu działaniu przedstawiono odpowiednio przy pomocy linii ciągłej (bez ultradźwięków) i linii przerywanej (z ultradźwiękami).



a)



b)

Rys.26. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla roztworów *L*-tyrozyny rozpuszczonej i przechowywanej przez okres 360 minut w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ w rozpuszczalnikach (a) etanol – 1M wodorotlenek sodu (7:3, v/v) i (b) etanol – 1M kwas solny (7:3, v/v). Wyniki dla roztworów poddawanych działaniu ultradźwięków i nie poddawanych temu działaniu przedstawiono odpowiednio przy pomocy linii ciągłej (bez ultradźwięków) i linii przerywanej (z ultradźwiękami).

W żadnym z tych dwóch przypadków skręcalność właściwa nie pozostawała niezmienna w czasie. Przeciwnie, obserwowano oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej w trakcie całego czasu trwania eksperymentu. Amplituda obserwowanych zmian była jednakże znacznie mniejsza w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$, niż w temperaturze $9 \pm 1^\circ\text{C}$.

Rejestracja zmian skręcalności właściwej w tej części eksperymentu polarymetrycznego miała na celu wyeksponowanie wpływu czynnika dyfuzyjnego na przebieg obserwowanego procesu, najprawdopodobniej będącego samorzutną, oscylacyjną konwersją chiralną L-tyrozyny. Wpływ czynnika dyfuzyjnego starano się wyeksponować na dwa sposoby:

- ❖ poprzez obniżenie temperatury badanego roztworu, co wiąże się ze wzrostem jego lepkości,
- ❖ poprzez porównanie przebiegu oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej roztworu mieszanego przy pomocy ultradźwięków oraz roztworu nie mieszanego.

Silny wzrost amplitudy oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ badanego roztworu o odczynie zasadowym wywołany obniżeniem temperatury i co za tym idzie wzrostem lepkości wskazuje na bardzo istotną rolę dyfuzji w badanym procesie, jak to ma często miejsce w przypadku różnych reakcji oscylacyjnych.

Zastosowanie ultradźwięków do mieszania badanych roztworów miało na celu ułatwienie dyfuzji cząsteczek L-tyrozyny w tych roztworach, a przez to obniżenie wpływu czynnika dyfuzyjnego na proces inwersji chiralnej i być może częściowe stłumienie, albo nawet wyeliminowanie zjawiska oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej. Kształt krzywych przedstawionych na rysunkach 25 i 26 pozwala wnioskować, że mieszanie badanych próbek ultradźwiękami rzeczywiście wpływa na amplitudę zmian skręcalności właściwej badanych roztworów.

Wyniki otrzymane w tej części eksperymentalnej pozwalają dostrzec, iż znaczący wzrost amplitudy oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej obserwujemy w środowisku zasadowym (rys.25a), a nieznaczny w środowisku kwaśnym (rys.25b) podczas mieszania roztworów w temperaturze $9 \pm 1^\circ\text{C}$. Możemy zatem pokusić się o stwierdzenie, iż środowisko zasadowe pełni rolę katalizatora oscylacyjnej inwersji sterycznej, ale mieszanie roztworów nie tłumii oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej, tak, jak tego można by oczekiwać poprzez zmniejszanie anizotropii gęstości badanych roztworów.

Wyniki polarymetryczne otrzymane w tej części eksperymentu w połączeniu z danymi pochodzącymi z techniki TLC dostarczają istotnych dowodów na występowanie

oscylacyjnej konwersji chiralnej *L*-tyrozyny rozpuszczonej w rozpuszczalnikach o niskiej masie cząsteczkowej oraz przechowywanej przez długi okres czasu w roztworach.

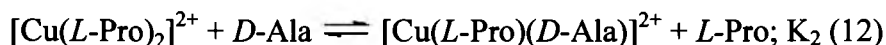
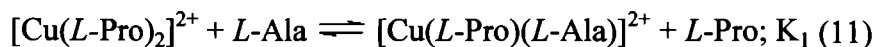
7.2. Oscylacyjne zmiany wartości współczynnika retardacji (R_F) oraz skręcalności właściwej *L*-alaniny

7.2.1. Chiralna chromatografia cienkowarstwowa

Celem niniejszych badań było eksperymentalne stwierdzenie czy *L*-alanina, która jest aminokwasem, ulega konwersji chiralnej, czyli przemianie enancjomeru *L* w *D* i odwrotnie w trzech różnych środowiskach, tj. obojętnym, kwasowym oraz zasadowym. Celowo użyto trzech typów rozpuszczalnika celem zbadania istotności środowiska dla zachodzenia bądź nie zachodzenia procesu oscylacyjnej konwersji chiralnej badanego związku.

Rozdział chromatograficzny enancjomerów alaniny prowadzono rozwijając chromatogramy jednokierunkowo w temperaturze $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Do badania użyto próbek *L*-alaniny rozpuszczonej w trzech różnych dwuskładnikowych rozpuszczalnikach. etanol-woda (7:3, v/v), etanol-1M HCl (7:3, v/v) oraz etanol-1M NaOH (7:3, v/v) przechowywanych w temperaturze pokojowej przez dziewięć dni. Stężenie *L*-alaniny w każdym z roztworów wynosiło 5 mg mL^{-1} ($5.61 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). Płytki chromatograficzne były impregnowane wodnym roztworem siarczynu(VI) miedzi(II), a następnie roztworem *L*-proliny.

Prawdopodobny mechanizm rozdziału enancjomerów *D* i *L*-alaniny przedstawia następujący układ równań:



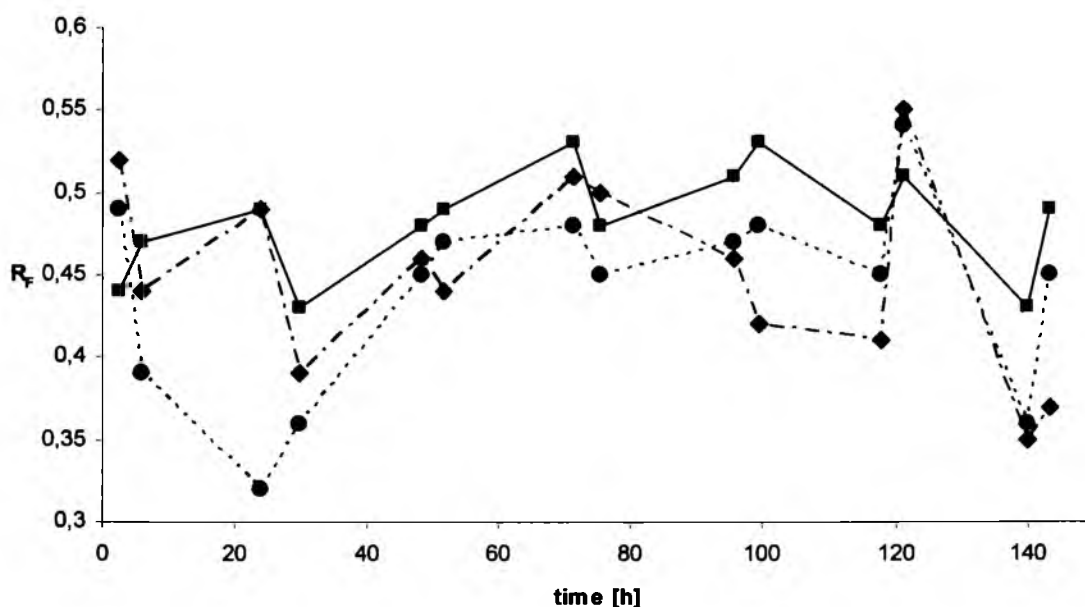
gdzie:

Powyższy mechanizm jest znany jako chromatograficzna wymiana ligandów lub chromatografia kompleksowania. Procedura TLC zastosowana w tych badaniach była zaczerpnięta z badań prowadzonych przez Bhushana i jego zespół [141]. Wprowadzono jednak następujące modyfikacje do zaproponowanej procedury:

- ♦ płytki szklane powlekane laboratoryjnie zastąpiono płytkami komercyjnymi pokrytymi żel krzemionkowym 60 F₂₅₄,

- ♦ zamiana *n*-butanolu na 2-propanol zachowując oryginalne ilości proporcji trzech składników fazy ruchomej. Zmiana ta miała na celu podniesienie wartości R_F alaniny, które w naszych warunkach były zbyt niskie przy użyciu *n*-butanolu.

Na rysunku 27 przedstawiono oscylacyjne zmiany współczynnika retardacji R_F w funkcji czasu w trzech różnych roztworach alaniny, przechowywanych w temperaturze pokojowej przez osiem dni. Oscylacje te obrazują konwersję *L*-alaniny do *D*-alaniny i odwrotnie, jako że badane aminokwasy nie ulegały rozkładowi w zastosowanych warunkach przechowywania próbek, a błąd pomiaru dla współczynnika retardacji w przypadku poprawnie i powtarzalnie przeprowadzonego eksperymentu TLC nie przekracza wartości 0.02.

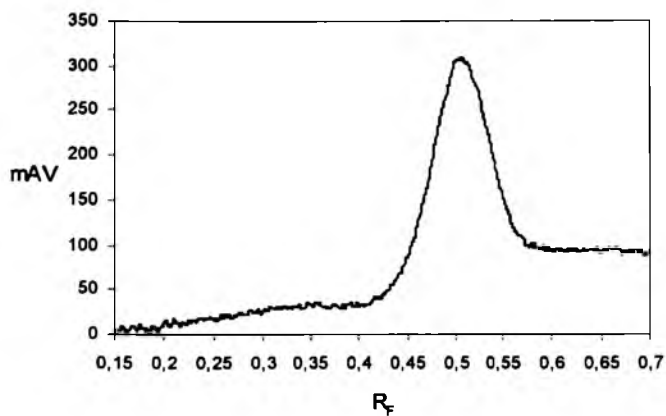


Rys.27. Zależność współczynnika retardacji R_F , od czasu przechowywania próbek w temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$ dla *L*-alaniny rozpuszczonej odpowiednio w roztworach: (◇) etanol – woda, (■) etanol – 1 M kwas chlorowodorowy, 7:3 (v/v), (●) etanol – 1 M wodorotlenek sodu, 7:3 (v/v).

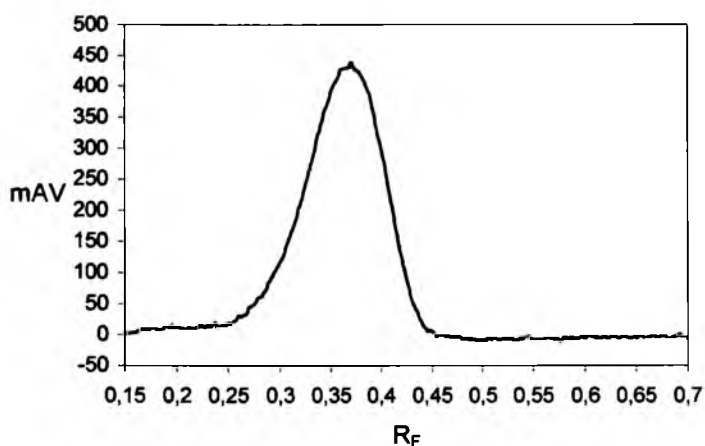
Wartość współczynnika retardacji dla analitu rozpuszczonego w mieszaninie etanol-woda zawierała się w granicach $0.40\pm 0.02 - 0.55\pm 0.02$. Dla analitu rozpuszczonego w etanolu z 1M HCl zawierała się w granicach $0.43\pm 0.02 - 0.54\pm 0.02$, a dla analitu rozpuszczony w etanolu z 1M NaOH zawierała się w granicach $0.32\pm 0.02 - 0.54\pm 0.02$. Jak widać z rys.27, oscylacyjne zmiany współczynnika retardacji znacznie przekraczają wartość błędu pomiaru. Wnioski, jakie możemy wyciągnąć są następujące: największe wahania R_F występują dla alaniny rozpuszczonej w etanolu z 1M NaOH, a najmniejsze dla alaniny rozpuszczonej w etanolu z 1M HCL. Opierając się na naszych badaniach dotyczących *L*-fenyloalaniny i *L*-

tyrozyny [142,143], na wynikach opublikowanych przez Bhushana i jego zespół [144] oraz powołując się na analogiczne aminokwasy i analogiczny system chromatografii cienkowarstwowej, a także opierając się na średnich wartościach R_F dla alaniny rozpuszczonej w rozpuszczalniku etanol-1M HCl, które są relatywnie najwyższe (środowisko kwaśne utrudnia tautomeryzację keto-enolową), możemy zaryzykować stwierdzenie, iż wyższe wartości R_F dotyczą antymeru *L*-alaniny (wartość równa $0,54 \pm 0,02$), a niższe antymeru *D* (wartość równa $0,32 \pm 0,02$).

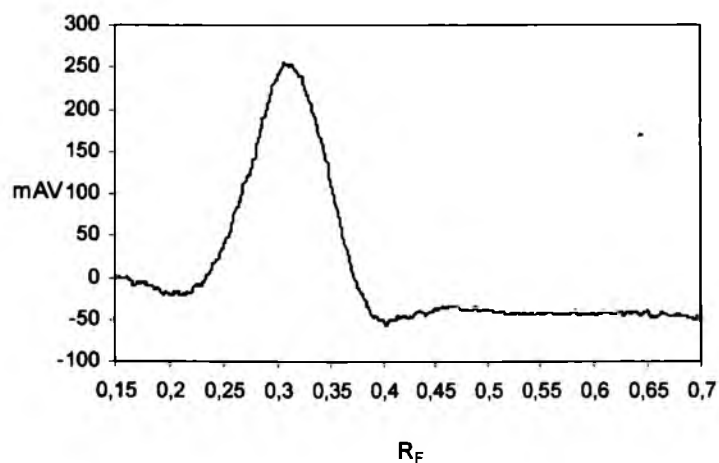
Rysunek 28a-f przedstawia sekwencję sześciu „stop klatek” obrazujących zmiany maksimów i kształtów profili stężeniowych *L*-alaniny rozpuszczonej w etanolu z 1M NaOH (7:3, v/v). W przypadku rozpuszczalników etanol-woda (7:3, v/v) i etanol-1M HCl (7:3, v/v) zmiany pozycji i kształtu pików były analogiczne jak w przypadku rozpuszczalnika etanol-1M NaOH. Oscylacyjna inwersja chiralna cząsteczek alaniny zachodzi w roztworach tak szybko, iż w większości przypadków nie pozwoliła na uchwycenie momentu, w którym obecne są oba antymery jednocześnie w roztworze. Zamiast tego obserwowaliśmy symetryczne profile stężeniowe poszczególnych czystych antymerów, lub też lekko nachylone profile stężeniowe obrazujące silną ilościową przewagę jednego antymeru nad drugim.



(a)

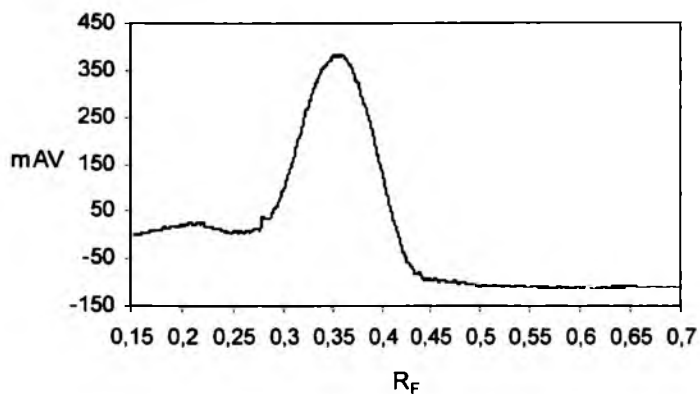


(b)

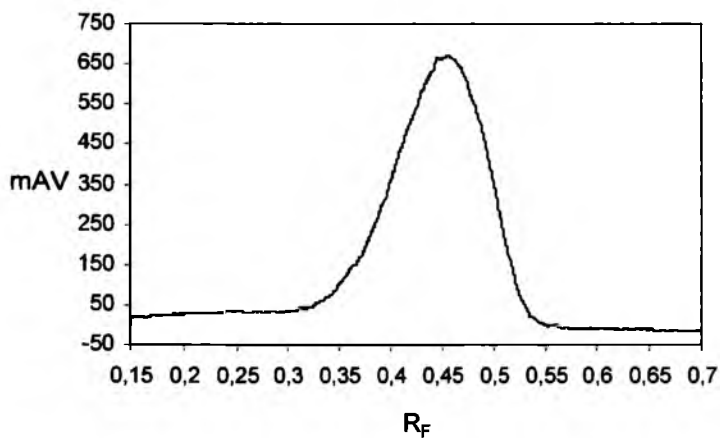


(c)

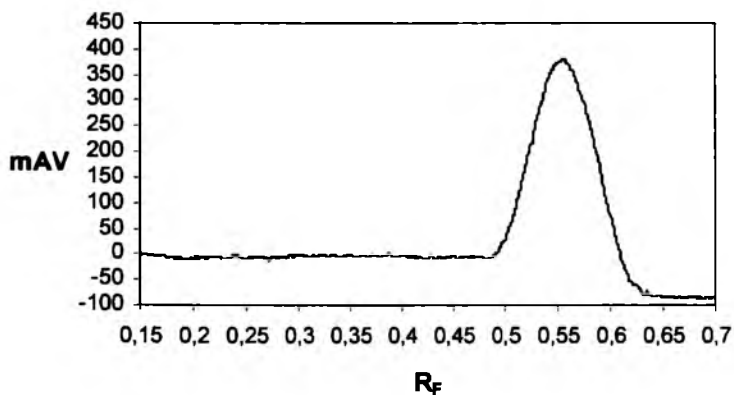
Rys.28a-c. Sekwencja sześciu wykresów przedstawiających profile stężeniowe dla roztworu L-alaniny rozpuszczonej w mieszaninie etanol – 1 M wodorotlenek sodu, 7:3 (v/v) po upływie (a) 2.5 h, (b) 6.0 h, i (c) 24.3 h przechowywania w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$.



(d)



(e)(f)



Rys.28d-f. Sekwencja sześciu wykresów przedstawiających profile stężeniowe dla roztworu L-alaniny rozpuszczonej w mieszaninie etanol – 1 M wodorotlenek sodu, 7:3 (v/v) po upływie (d) 30.0 h, (e) 96.0 h, i (f) 171.5 h przechowywania w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

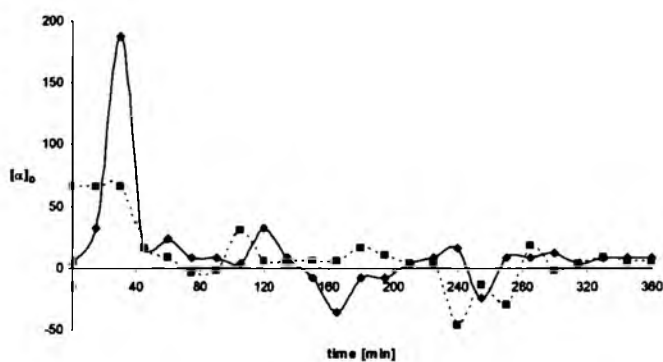
Ostatecznie nie można wykluczyć, że obserwowana oscylacyjna inwersja chiralna *L*-alaniny jest nie tylko wynikiem przechowywania jej w wyżej wymienionych rozpuszczalnikach, ale dodatkowo wywiera na nią pewien wpływ sam proces chromatograficzny i bezpośredni kontakt chiralnego analitu ze składnikami układu chromatograficznego.

7.2.2. Polarymetria

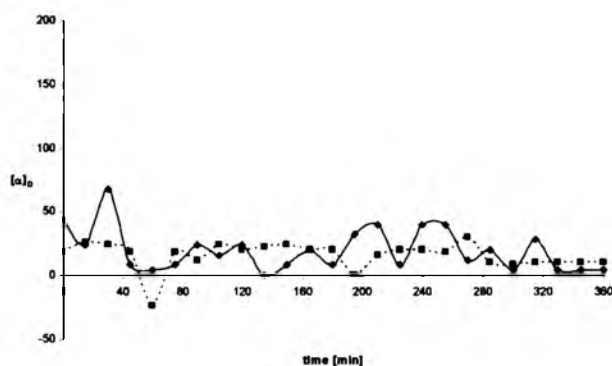
Skręcalność właściwą roztworu *L*-alaniny rozpuszczonej w trzech różnych dwuskładnikowych rozpuszczalnikach. etanol-woda (7:3, v/v), etanol-1M HCl (7:3, v/v) oraz etanol-1M NaOH (7:3, v/v) badano w dwóch różnych temperaturach $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ i $9\pm 2^{\circ}\text{C}$ przez okres 360 minut. Pomiary były rejestrowane w sposób nieciągły w 15-minutowych odstępach czasu. W każdej z temperatur były jednocześnie prowadzone dwa pomiary, dla roztworu poddanego mieszaniu za pomocą ultradźwięków i dla roztworu nie mieszanego.

W żadnym z badanych roztworów skręcalność właściwa *L*-alaniny nie utrzymywała się na stałym poziomie, a zamiast tego jej wartość wykazywała zmiany oscylacyjne. Jednakże amplituda tych zmian w temperaturze pokojowej była niższa w porównaniu z amplitudą zmian w temperaturze obniżonej. Wyniki z pomiarów prowadzonych w temperaturze $9\pm 2^{\circ}\text{C}$ przedstawia rysunek 1a-c, a w temperaturze $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ rysunek 2a-c.

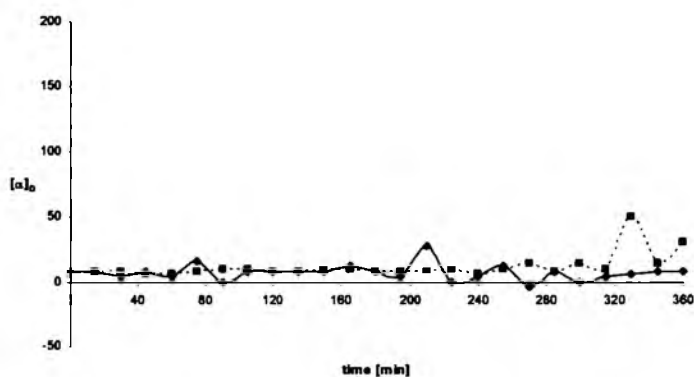
(a)



(b)

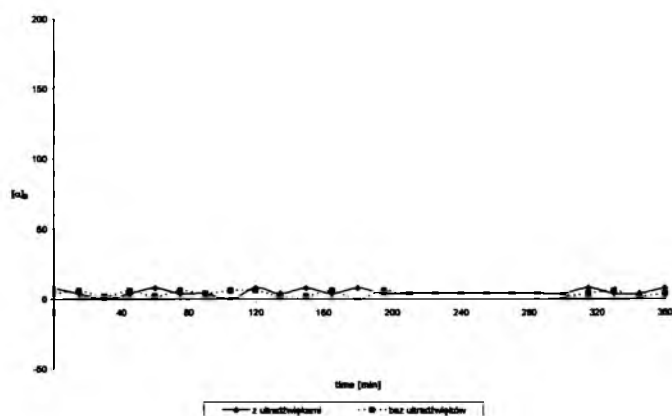


(c)

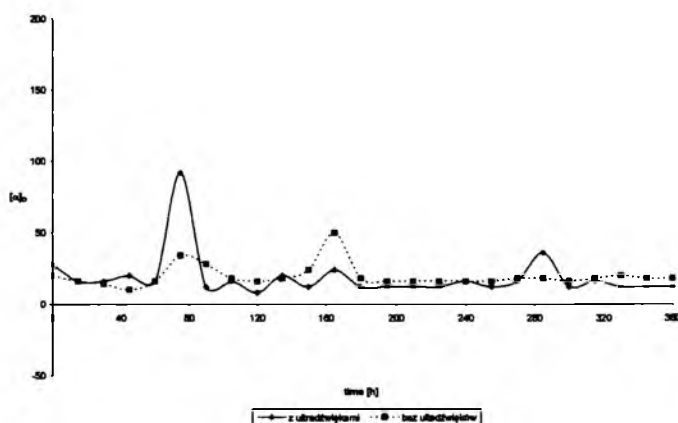


Rys.29. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla roztworów *L*-alaniny rozpuszczonej i przechowywanej przez okres 360 minut w temperaturze $9 \pm 1^\circ\text{C}$ w rozpuszczalnikach (a) etanol – woda (7:3, v/v) i (b) etanol – 1M kwas solny (7:3, v/v), i etanol – 1M wodorotlenek sodu (7:3, v/v). Wyniki dla roztworów poddawanych działaniu ultradźwięków i nie poddawanych temu działaniu przedstawiono odpowiednio przy pomocy linii ciągłej (bez ultradźwięków) i linii przerywanej (z ultradźwiękami).

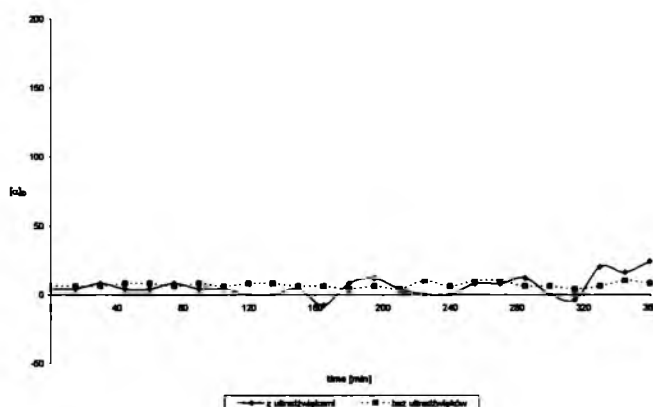
(a)



(b)



(c)



Rys.30. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla roztworów *L*-alaniny rozpuszczonej i przechowywanej przez okres 360 minut w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ w rozpuszczalnikach (a) etanol – woda (7:3, v/v) i (b) etanol – 1M kwas solny (7:3, v/v), i etanol – 1M wodorotlenek sodu (7:3, v/v). Wyniki dla roztworów poddawanych działaniu ultradźwięków i nie poddawanych temu działaniu przedstawiono odpowiednio przy pomocy linii ciągłej (bez ultradźwięków) i linii przerywanej (z ultradźwiękami).

Pierwszą obserwacją, jakiej można dokonać na podstawie przedstawionych na wykresach wyników jest to, iż amplituda zmian wartości skręcalności właściwej dla roztworów poddawanych mieszaniu jest większa, niż dla tych badanych bez mieszania. Po wtóre amplituda zmian jest najwyższa dla roztworów obojętnych (Rys. 29a i 30a), natomiast najmniejsza dla roztworów zasadowych (Rys. 29c i 30c). Amplituda oscylacyjnych zmian wartości skręcalności właściwej dla *L*-alaniny plasuje się pomiędzy amplitudą dla *L*-tyrozyny i *L*-fenyloalaniny. Ponadto wahania skręcalności właściwej dla przebadanej *L*-alaniny jest o wiele wyraźniejsza dla roztworów kwaśnych, niż dla roztworów zasadowych.

Tak więc wyniki badań przeprowadzonych techniką chiralnej chromatografii cienkowsarstwowej oraz badań polarymetrycznych zdają się jednoznacznie wskazywać na to, iż *L*-alanina może ulegać oscylacyjnej konwersji chiralnej, po uprzednim rozpuszczeniu w trzech typach rozpuszczalników.

7.3. Oscylacyjne zmiany wartości współczynnika retardacji (R_F) oraz skręcalności właściwej ($[\alpha]_D$) L - α -fenyloalaniny

7.3.1. Chiralna chromatografia cienkowarstwowa

Celem przeprowadzonych badań było eksperymentalne stwierdzenie, czy L - α -fenyloalanina ulega oscylacyjnej inwersji chiralnej zgodnie z równaniem:

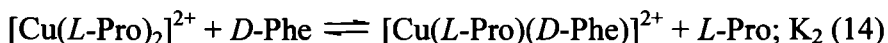
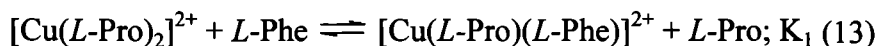


Rozdział chromatograficzny enancjomerów α -fenyloalaniny prowadzono rozwijając próbki fenyloalaniny rozpuszczonej w trzech typach rozpuszczalników:

- ♦ etanol – woda w stosunku objętościowym 7:3 (v/v),
- ♦ etanol – bufor zasadowy o pH = 9 w stosunku objętościowym 7:3 (v/v),
- ♦ etanol – lodowaty kwas octowy w stosunku objętościowym 7:3 (v/v).

Stężenie α -fenyloalaniny w każdej z próbek wynosiło 1 mg/ml, a czas ich przechowywania wynosił osiem dni. Rozwijanie chromatogramów prowadzono w wariancie jednokierunkowym, w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Faza ruchoma składała się z n -butanolu, acetonitrylu oraz wody w proporcjach objętościowych 6:2:3 (v/v/v). Roztwory nanoszono na uprzednio przygotowane płytki chromatograficzne impregnowane wodnym roztworem siarczynu(VI) miedzi(II), a następnie roztworem L -proliny.

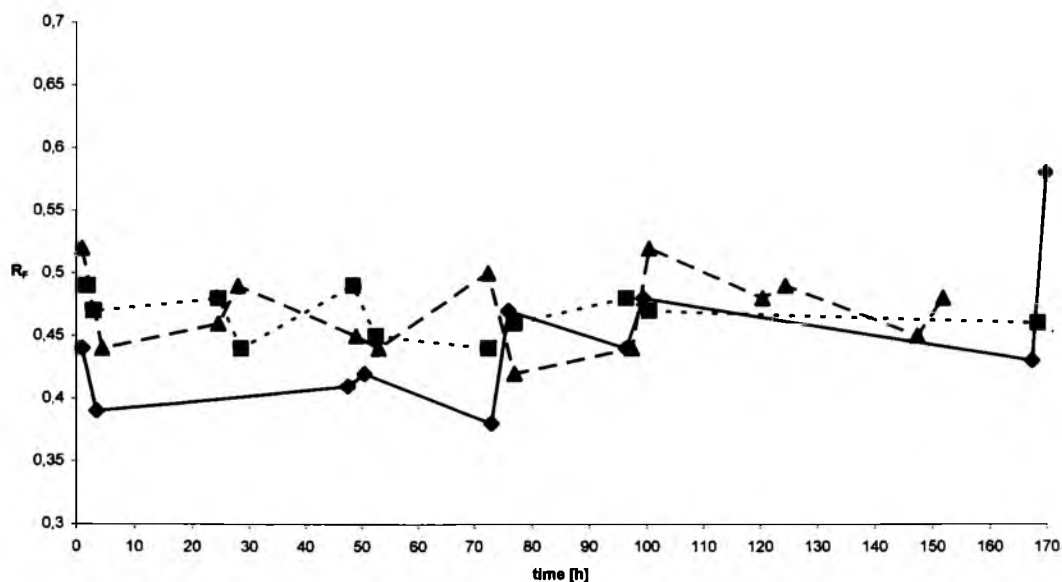
Prawdopodobny mechanizm rozdziału enancjomerów α -fenyloalaniny można przedstawić następującymi równaniami:



gdzie K_1 i K_2 przedstawiają stałe równowagi reakcji, natomiast nierówność $K_1 \neq K_2$ jest warunkiem rozdziału chromatograficznego dwu antymerów.

Powyższy mechanizm jest znany jako chromatograficzna wymiana ligandów lub chromatografia kompleksowania. Procedurę chromatograficzną TLC zastosowaną w tych badaniach zaczerpnięto z badań prowadzonych przez Bhushana i jego zespół [145]. Dokonano w niej jednak modyfikacji, która polegała na zastąpieniu ręcznie powlekanych żelom krzemionkowym płytek chromatograficznych płytkami komercyjnymi pokrytymi żelom krzemionkowym 60 F₂₅₄.

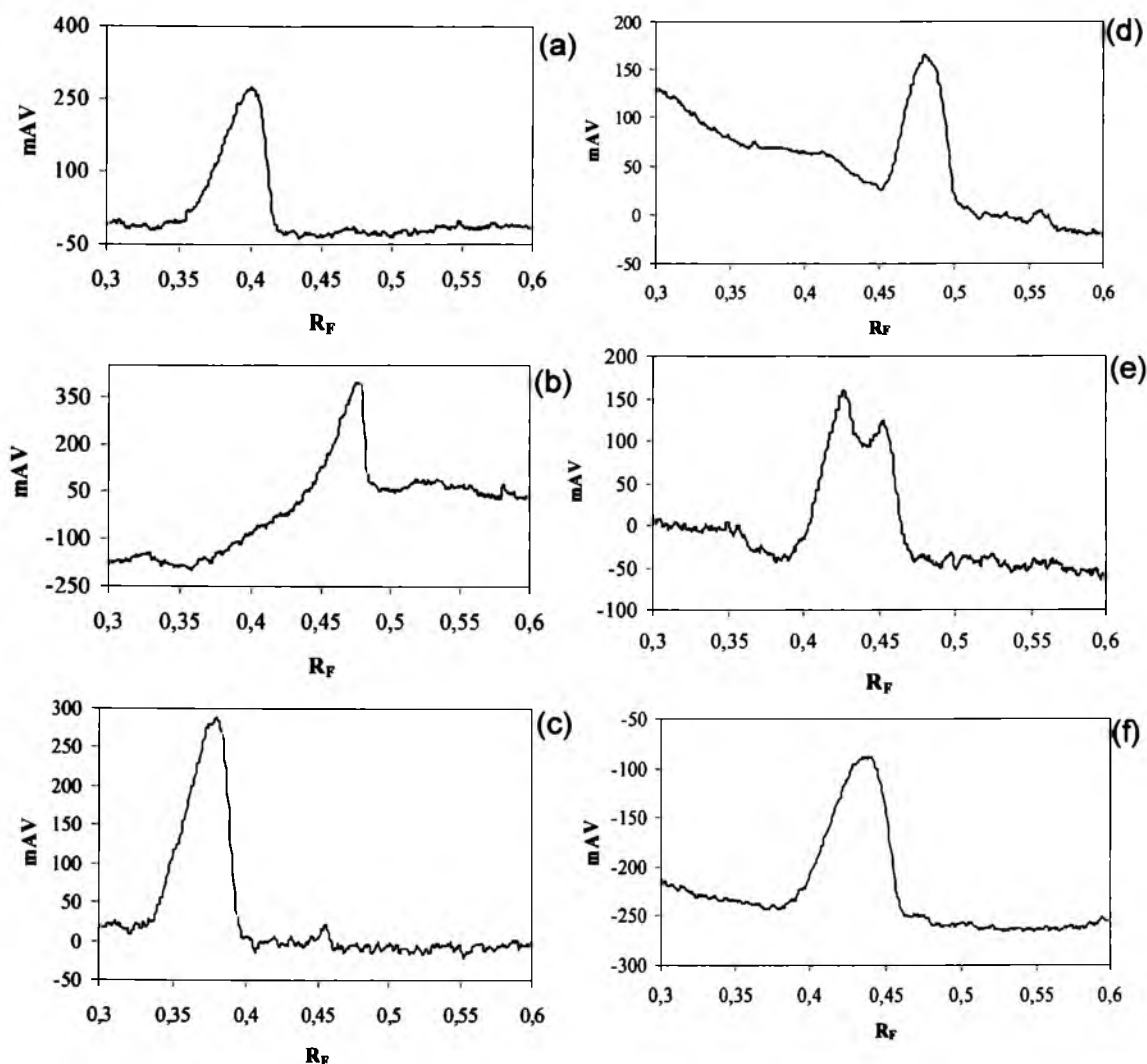
Rysunek 31 przedstawia oscylacyjne zmiany współczynnika opóźnienia (R_F) L - α -fenyloalaniny rozpuszczonej w trzech różnych rozpuszczalnikach przechowywanych przez osiem dni w temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$. Obserwowane oscylacje najprawdopodobniej odzwierciedlają strukturalną konwersję L - α -fenyloalaniny w jej antymer D , gdyż zastosowane warunki przechowywania próbek nie powodują jej rozkładu. Błąd eksperymentalny dla wartości R_F z reguły w przypadku związków nie ulegających konwersji chiralnej nie przekracza 0,02 bezwymiarowej jednostki R_F . W przeprowadzonym eksperymencie wartości współczynnika R_F dla L - α -fenyloalaniny rozpuszczonej w rozpuszczalniku etanolowo - wodnym oscylowały w granicach od 0.37 ± 0.02 do 0.58 ± 0.02 . Dla roztworu etanol-bufor zasadowy przedział ten wynosił od 0.42 ± 0.02 do 0.49 ± 0.02 , a w przypadku roztworu sporządzonego w mieszaninie wody i kwasu octowego przedział oscylacji wynosił od $0.42 \pm 0,02$ do $0,52 \pm 0,02$. Wartość R_F otrzymana w analogicznym eksperymencie przeprowadzonym przez Bhushana i jego zespół [145] dla L - α -fenyloalaniny wynosiła 0.39, a dla jej antymeru 0.32. Wprowadzona przez nas modyfikacja układu chromatograficznego wpłynęła na ogólny wzrost wartości R_F w porównaniu z oryginalnym układem Bhushana, a rozdział pików w oryginalnym układzie chromatograficznym był nieco gorszy, niż w naszym zmodyfikowanym układzie.



Rys.31. Zależność wartości współczynnika retardacji (R_F) od czasu przechowywania próbek w temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$ dla L - α -fenyloalaniny rozpuszczonej odpowiednio w rozpuszczalnikach (◆) etanol – woda, 7:3 (v/v), (■) etanol – bufor zasadowy o pH=9, 7:3 (v/v), (▲) etanol-lodowaty kwas octowy, 7:3 (v/v).

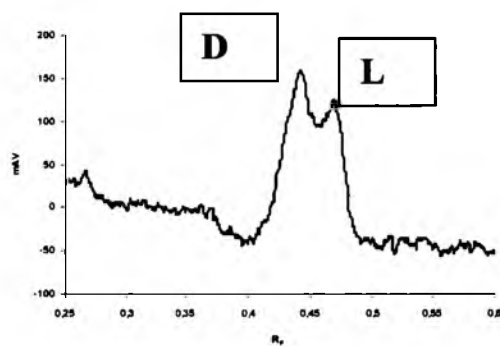
Najwyższą średnią wartość współczynnika opóźnienia (R_F) obserwuje się dla *L*- α -fenyloalaniny rozpuszczonej w mieszaninie wody i kwasu octowego, a najniższą w rozpuszczalniku etanolowo – wodnym. Wyniki otrzymane techniką TLC potwierdzają wpływ środowiska kwasowego i zasadowego na proces transenancjomeryzacji. Wyższe średnie wartości współczynnika opóźnienia R_F obserwujemy w mieszaninie rozpuszczalników etanol – lodowaty kwas octowy, co sugeruje, że stopień sterycznej konwersji w tym rozpuszczalniku jest niższy, niż w przypadku mieszanin etanol – woda i etanol – bufor zasadowy (lodowaty kwas octowy hamuje proces transenancjomeryzacji, podczas gdy środowisko zasadowe i amfiprotyczne katalizuje ten proces).

Ważnym dowodem na to, iż proces oscylacyjnej inwersji chiralnej *L*- α -fenyloalaniny skutecznie zachodzi w środowisku reakcji jest nie tylko oscylacyjna zmiana pozycji maksimów pików stężeniowych analitu na skali wartości R_F , lecz także zmiany kształtów tychże profili. Zmiany pozycji maksimów profili stężeniowych i ich kształtów zostały przedstawione na rysunku 32a-f jako sekwencja poszczególnych „stop-klatek” dla analitu rozpuszczonego w rozpuszczalniku etanol – woda (7:3, v/v), który następnie przechowywano w roztworze przez pewien okres czasu. Dla roztworu etanol – bufor zasadowy i etanol – lodowaty kwas octowy zmiany pozycji maksimów profili stężeniowych analitu były analogiczne do otrzymanych w rozpuszczalniku etanol – woda, jednakże tylko w mieszaninie rozpuszczalników etanol – woda uzyskano sporadyczny i częściowy rozdział enancjomerów rozpatrywanego aminokwasu.

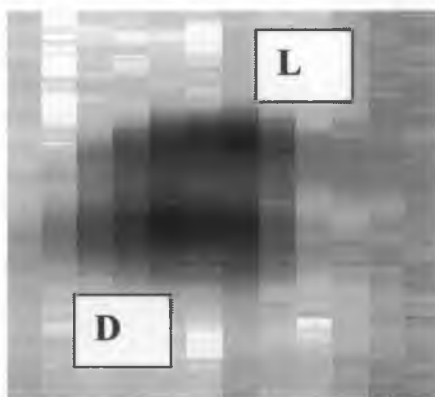


Rys.32. Sekwencja sześciu wykresów przedstawiających chromatograficzne profile stężeniowe dla roztworu *L*- α -fenyloalaniny rozpuszczonej w mieszaninie etanolu i wody w stosunku objętościowym 7: 3 (v/v) po upływie (a) 47.5 h, (b) 50.5 h, (c) 73 h, (d) 96.5 h, (e) 99.5 h, i (f) 167.5 h przechowywania w temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$.

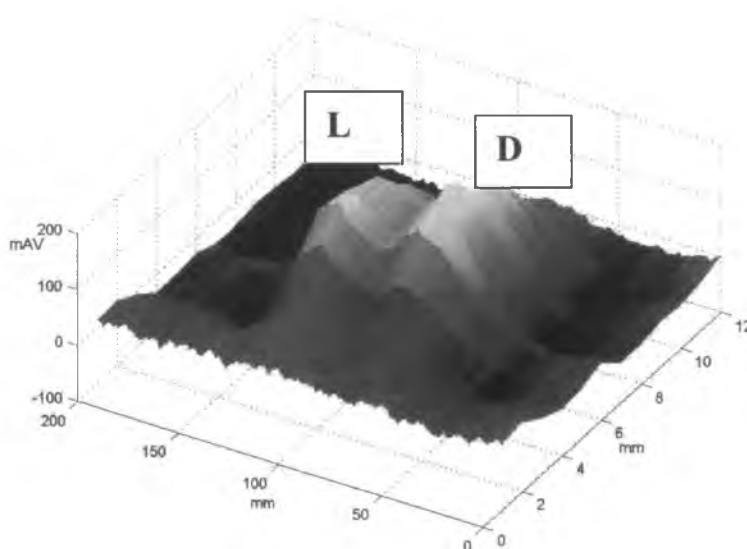
Nasuwa się zatem pytanie, dlaczego zmiany pozycji maksimów pików stężeniowych analitu na skali wartości R_F i zmiany kształtów tychże profili są tak przekonywującym dowodem na zachodzenie oscylacyjnego procesu transenancjomeryzacji? Oscylacyjna strukturalna inwersja aminokwasów jest bardzo szybka i większości przypadków obecność obu antymerów obok siebie, jako mieszaniny racemicznej jest trudna w sposób chromatograficzny do uchwycenia. O wiele częściej na chromatogramach obserwujemy jeden z enancjomerów jako pojedynczy pik lub jako pik dominujący. Rysunek 33 przedstawia typowy przykład niepełnego rozdziału próbki *L*- α -fenyloalaniny rozpuszczonej w rozpuszczalniku etanolowo - wodnym do jej antymeru *D*, która była przechowywana przez okres 99.5h.



(a)



(b)



(c)

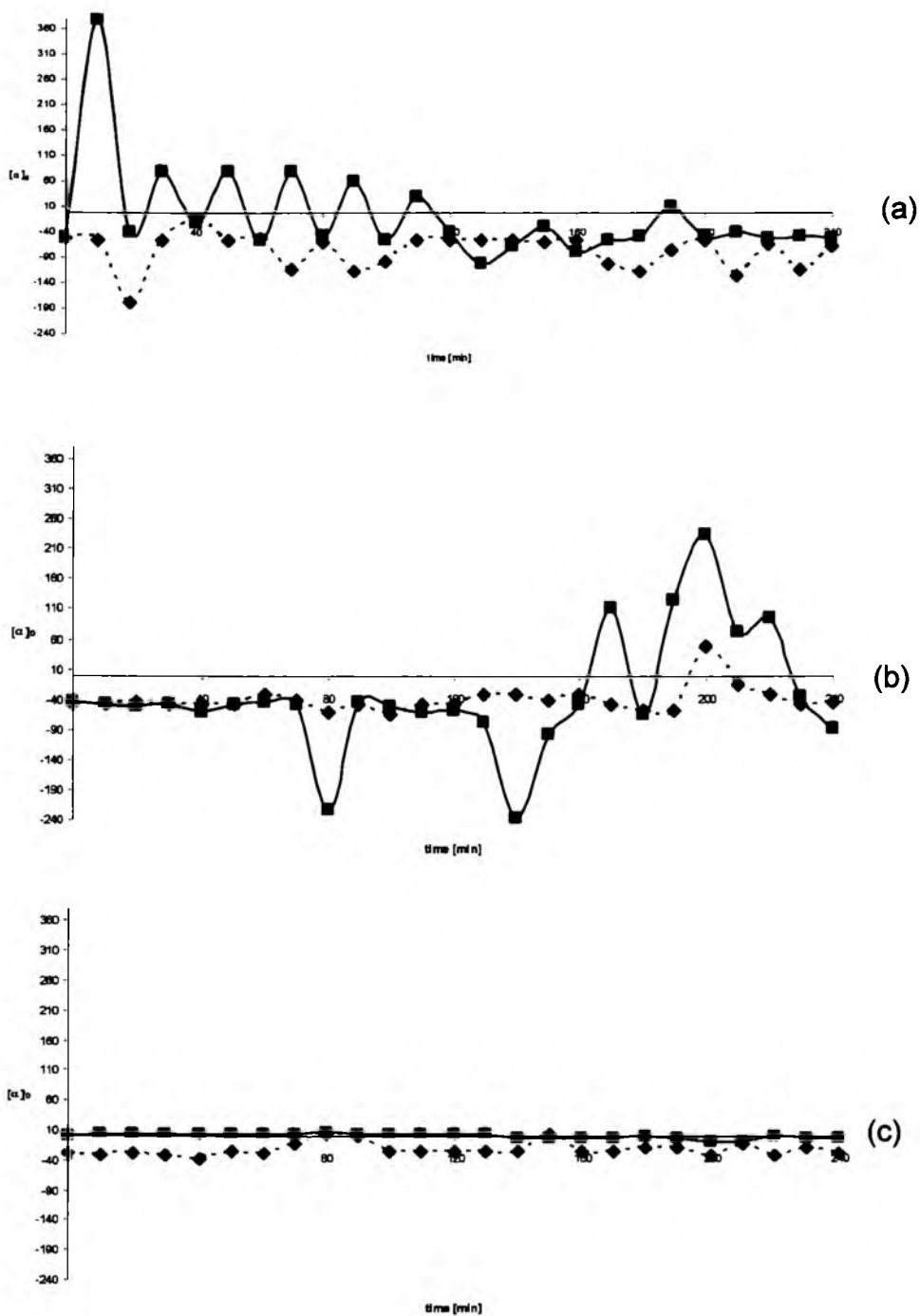
Rys.33. Densytogram (a), wideoskan (b), i chromatogram 3D ilustrujące rozdział enancjomerów *D* i *L*- α -fenyloalaniny po upływie 99.5h przechowywania analitu w układzie etanolowo – wodnym (7:3, v/v) w temperaturze $22\pm 1^{\circ}\text{C}$. Rysunki (b) i (c) skonstruowano ze skanów densytometrycznych rejestrowanych wzdłuż kierunku rozwijania chromatogramu w odstępach 1 mm.

W świetle uzyskanych wyników możemy wysunąć następujące wnioski będące odpowiedzią na postawione sobie wcześniej pytanie:

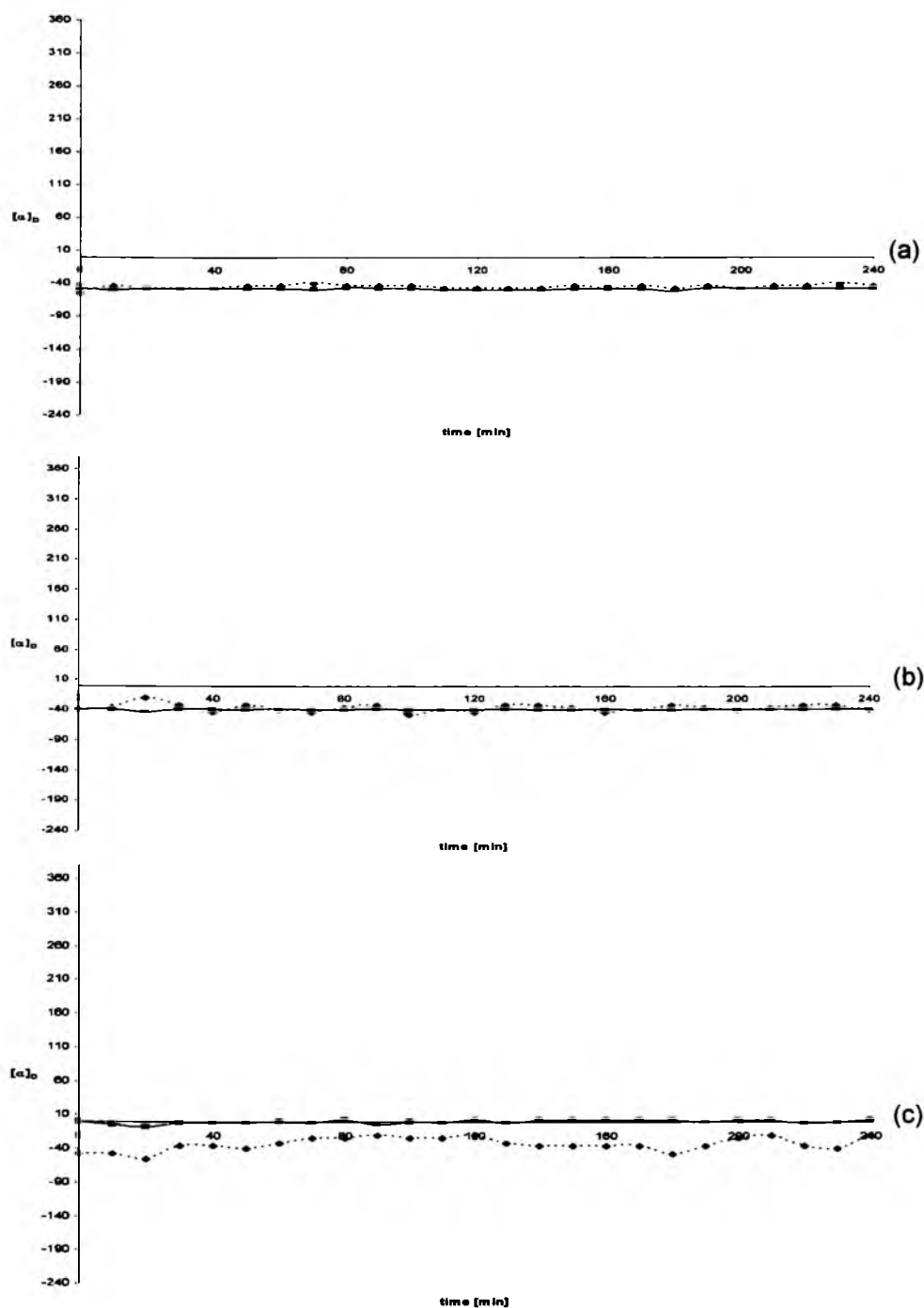
- ❖ w zastosowanych rozpuszczalnikach aminokwasy nie ulegają strukturalnej destrukcji,
- ❖ w technice TLC produkty oligopeptyzacji zostają silnie zaadsorbowane na starcie płytki chromatograficznej, przez co ich pików nie widać na chromatogramie
- ❖ na chromatogramach TLC obserwujemy więc tylko dwa lepiej lub gorzej rozdzielone piki antymerów *D* i *L*- α -fenyloalaniny.

7.3.2. Polarymetria

Skręcalność właściwą roztworu *L*- α -fenyloalaniny rozpuszczonej w trzech różnych dwuskładnikowych rozpuszczalnikach etanol-woda (7:3, v/v), etanol-lodowy kwas octowy (7:3, v/v) oraz etanol-bufor zasadowy o pH = 9 (7:3, v/v) badano w dwóch różnych temperaturach $9\pm 1^{\circ}\text{C}$ i $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ przez okres 240 minut. Pomiary były rejestrowane w sposób nieciągły w 10-minutowych odstępach czasu. Dla każdej z temperatur były prowadzone dwa pomiary, dla roztworu nie mieszanego i dla roztworu poddanego mieszaniu przy pomocy ultradźwięków. Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunkach 34 i 35.



Rys.34. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla roztworów *L*- α -fenyloalaniny rozpuszczonej i przechowywanej przez okres 240 minut w temperaturze 9 ± 1 °C w rozpuszczalnikach (a) etanol-woda (7:3, v/v), (b) etanol – bufor zasadowy o pH = 9 (7:3, v/v) i (c) etanol – lodowy kwas octowy (7:3, v/v). Wyniki dla roztworów poddawanych działaniu ultradźwięków i nie poddawanych temu działaniu przedstawiono odpowiednio przy pomocy linii ciągłej (bez ultradźwięków) i linii przerywanej (z ultradźwiękami).



Rys.35. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla roztworów *L*- α -fenyloalaniny rozpuszczonej i przechowywanej przez okres 240 minut w temperaturze 22 ± 1 °C w rozpuszczalnikach (a) etanol-woda (7:3, v/v), (b) etanol – bufor zasadowy o pH = 9 (7:3, v/v) i (c) etanol – lodowy kwas octowy (7:3, v/v). Wyniki dla roztworów poddawanych działaniu ultradźwięków i nie poddawanych temu działaniu przedstawiono odpowiednio przy pomocy linii ciągłej (bez ultradźwięków) i linii przerywanej (z ultradźwiękami).

W żadnym z tych trzech przypadków skręcalność właściwa nie pozostawała niezmienna w czasie. Przeciwnie, obserwowano oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej w trakcie trwania całego eksperymentu, jednakże amplituda tych oscylacji była znacznie wyższa w temperaturze 9 ± 1 °C, aniżeli w temperaturze 22 ± 1 °C.

Rejestracja zmian skręcalności właściwej w przeprowadzonym eksperymencie miała na celu wyeksponowanie czynnika dyfuzyjnego na przebieg obserwowanego procesu, najprawdopodobniej będącego samorzutną, oscylacyjną inwersją *L*- α -fenyloalaniny. Wpływ czynnika dyfuzyjnego starano się wyeksponować na dwa sposoby:

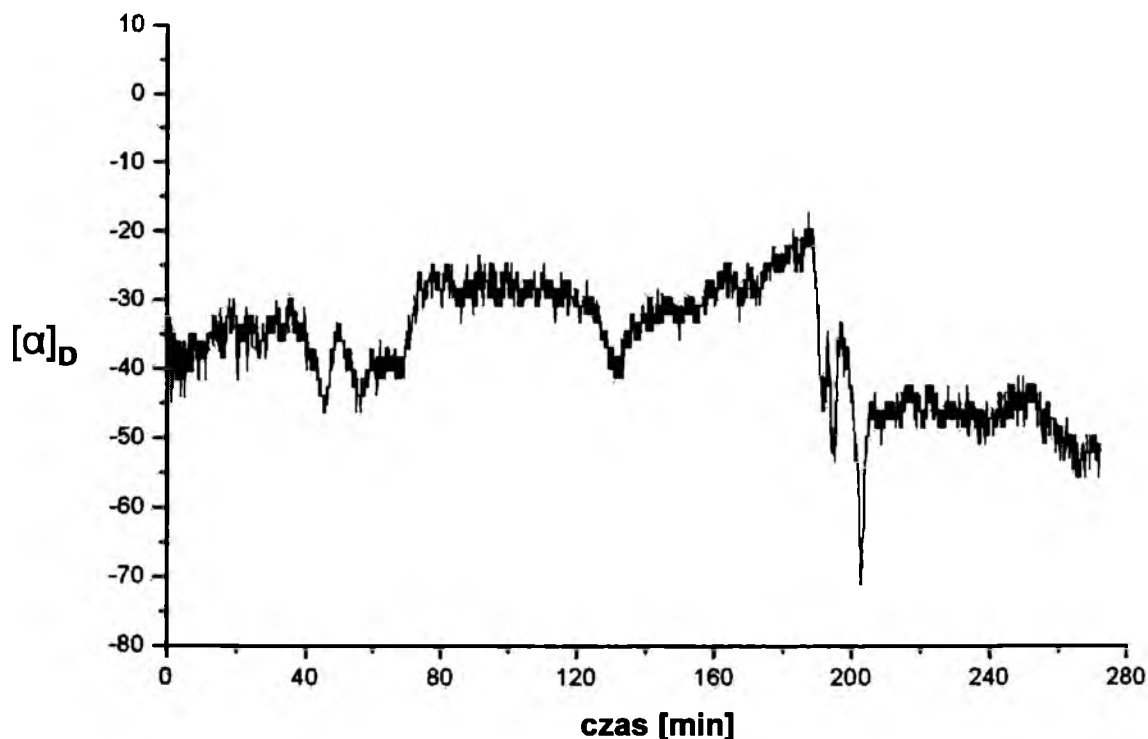
- ❖ poprzez obniżenie temperatury badanego roztworu, co wiąże się ze wzrostem jego lepkości,
- ❖ poprzez porównanie przebiegu oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej roztworu mieszanego przy pomocy ultradźwięków oraz roztworu nie mieszanego.

Silny wzrost amplitudy oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ badanych roztworów, wywołany obniżeniem ich temperatury i jednoczesnym wzrostem ich lepkości wskazuje na bardzo istotną rolę dyfuzji w badanym procesie, jak to ma bardzo często miejsce w przypadku różnych reakcji oscylacyjnych. W temperaturze 22°C (rys.2) praktycznie nie widać oscylacji.

Zastosowanie ultradźwięków do mieszania badanych roztworów miało na celu ułatwienie dyfuzji cząsteczek *L*- α -fenyloalaniny w tych roztworach, a przez to obniżenie wpływu czynnika dyfuzyjnego na proces inwersji chiralnej i być może częściowe stłumienie, albo nawet wyeliminowanie zjawiska oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej. Kształt krzywych przedstawionych na rysunku 34 (a) i (b) pozwala wnioskować, że mieszanie badanych próbek ultradźwiękami wpływa na amplitudę skręcalności właściwej badanych roztworów, w tym konkretnym przypadku obniżając amplitudę oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej, tak, jak tego należało oczekiwać dla próbek poddawanych mieszanii.

Środowisko reakcji również miało istotny wpływ na oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej. Amplituda obserwowanych zmian była zdecydowanie najwyższa w środowisku zasadowym (rys.34b), nieco niższa w środowisku amfiprotycznym (rys.34a), a najniższa w środowisku kwaśnym (rys.34c) w temperaturze obniżonej. W temperaturze pokojowej zmiany w każdym ze środowisk były niewielkie (rys.35). Możemy zatem pokusić się o stwierdzenie, iż środowisko zasadowe pełni rolę katalizatora oscylacyjnej inwersji sterycznej poprzez tautomerię keto-enolową.

W kolejnym eksperymencie polarymetrycznym rejestrację oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej przeprowadzono w sposób ciągły, również w temperaturze 22°C przez pierwsze 4,5 godziny od chwili sporządzenia roztworu *L*- α -fenyloalaniny w rozpuszczalniku etanolowo-wodnym. Uzyskany wynik przedstawiono na rys. 36.



Rys.36. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu w temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$ dla roztworu kwasu *L*- α -fenyloalaniny w rozpuszczalniku dwuskładnikowym etanol-woda, w stosunku objętościowym 7:3 (rejestracja ciągła).

Wynik ciągłej rejestracji zmian skręcalności właściwej roztworu *L*- α -fenyloalaniny w funkcji czasu stanowi dodatkowy dowód na to, iż zmiany te mają charakter oscylacyjny, co potwierdza przypuszczenie, iż obserwowane oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ są rezultatem oscylacyjnej konwersji chiralnej *L*- α -fenyloalaniny.

Wyniki polarymetryczne otrzymane w tej części eksperymentalnej w połączeniu z danymi pochodzącymi z techniki TLC dostarczają istotnych dowodów na występowanie oscylacyjnej konwersji chiralnej *L*- α -fenyloalaniny rozpuszczonej w rozpuszczalnikach o niskiej masie cząsteczkowej oraz przechowywanej przez długi okres czasu w roztworach.

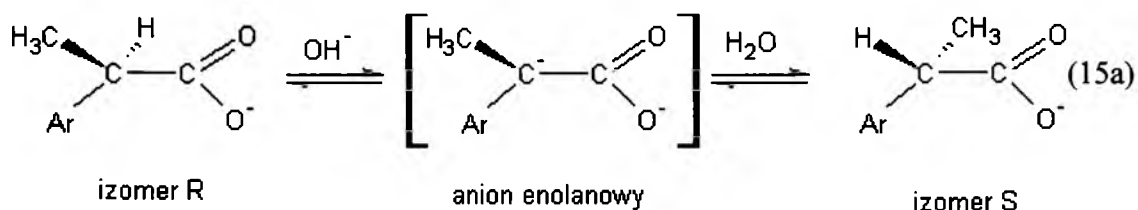
7.4. Kwas mlekowy

7.4.1. Oscylacyjne zmiany wartości współczynnika retardacji (R_F) oraz skręcalności właściwej ($[\alpha]_D$) kwasu *L*-mlekowego

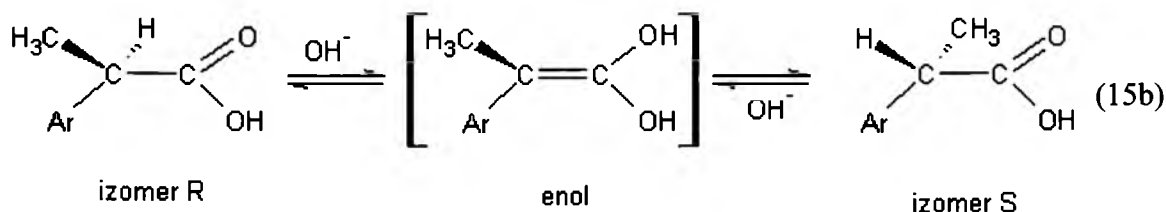
7.4.1.1. Chiralna chromatografia cienkowarstwowa

Celem niniejszych badań było eksperymentalne stwierdzenie, czy kwas *L*-(+)-mlekowy ulega konwersji chiralnej, to znaczy przemianie enancjomeru *L*-(+) w *D*-(-). W przypadku niskocząsteczkowych chiralnych kwasów karboksylowych, takich, jak pochodne kwasu octowego, propionowego, masłowego itp., proces ten można przedstawić w postaci bardziej szczegółowej [146]:

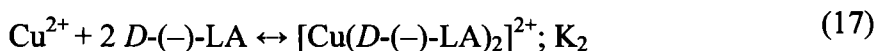
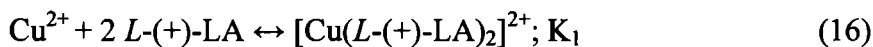
♦ w środowisku wodnym:



♦ w środowisku bezwodnym lub w obecności niewielkich ilości wody:

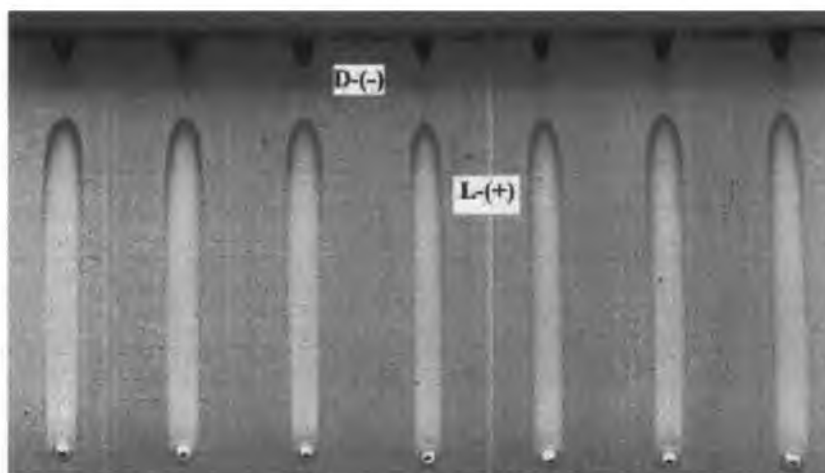


Warunki rozdziału dla układu TLC zaczerpnięto z publikacji Cecchi'ego i współpracowników [147], którzy jako pierwsi opracowali warunki rozdziału chromatograficznego antymerów kwasu mlekowego. Mechanizm rozdziału enancjomerów kwasu mlekowego polega na chelatowaniu dwuwartościowego kationu miedzi przez każdy z enancjomerów.

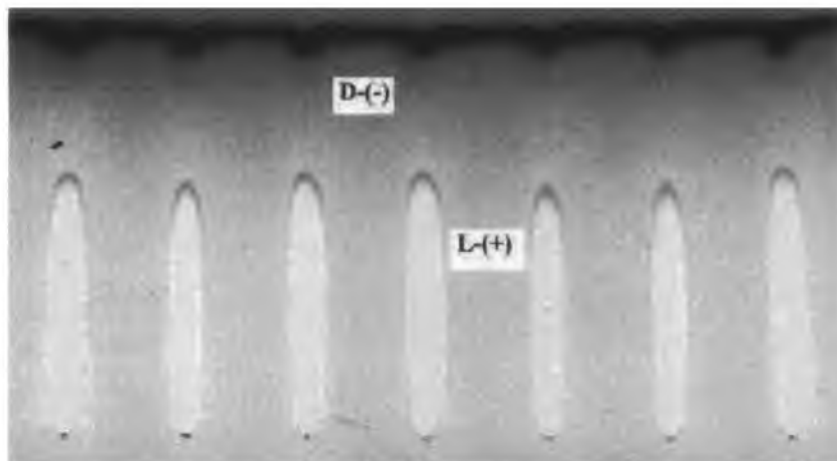


gdzie: LA to kwas mlekowy, K_1 i K_2 przedstawiają stałe równowagi odpowiednich reakcji chelatowania, natomiast nierówność $K_1 \neq K_2$ jest warunkiem rozdziału chromatograficznego dwu antymerów kwasu mlekowego.

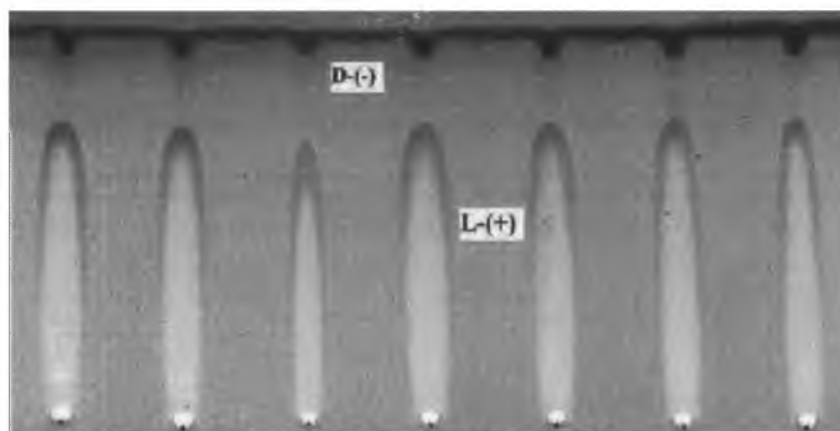
W prowadzonych przez nas doświadczeniach udało się z powodzeniem odtworzyć opracowane przez wspomnianych badaczy warunki rozdziału antymerów kwasu mlekowego. Najpierw jednak sporządzono trzy roztwory czystego enancjomeru kwasu *L*-(+)-mlekowego rozpuszczonego odpowiednio (i) w mieszaninie etanolu i wody w stosunku objętościowym 7:3, (ii) w mieszaninie etanolu i lodowatego kwasu octowego w stosunku objętościowym 7:3 oraz (iii) w mieszaninie etanolu i buforu zasadowego o pH = 9 w stosunku objętościowym 7:3. Tak przygotowane roztwory były przechowywane w zamkniętych naczyniach przez okres 12 dni w temperaturze pokojowej. Przechowywanie próbek kwasu *L*-(+)-mlekowego w trzech rodzajach roztworów miało na celu sprawdzenie, czy i jak środowisko wpływa na ewentualne zajście reakcji konwersji chiralnej. Najpierw w odstępach półgodzinnych, a następnie jednodniowych pobierano próbki tych trzech roztworów i poddawano je analizie chromatograficznej celem wykrycia obecności w nich kwasu *D*-(-)-mlekowego. Celowo użyto trzech typów rozpuszczalników celem zbadania istotności środowiska dla zachodzenia bądź nie zachodzenia procesu oscylacyjnej konwersji chiralnej badanego związku. Na rys. 37 przedstawiono przykładowe wideoskany płytek chromatograficznych, na których rozwinięto próbki trzech roztworów kwasu *L*-(+)-mlekowego, przechowywanych w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ przez okres pięciu dni.



(a)



(b)



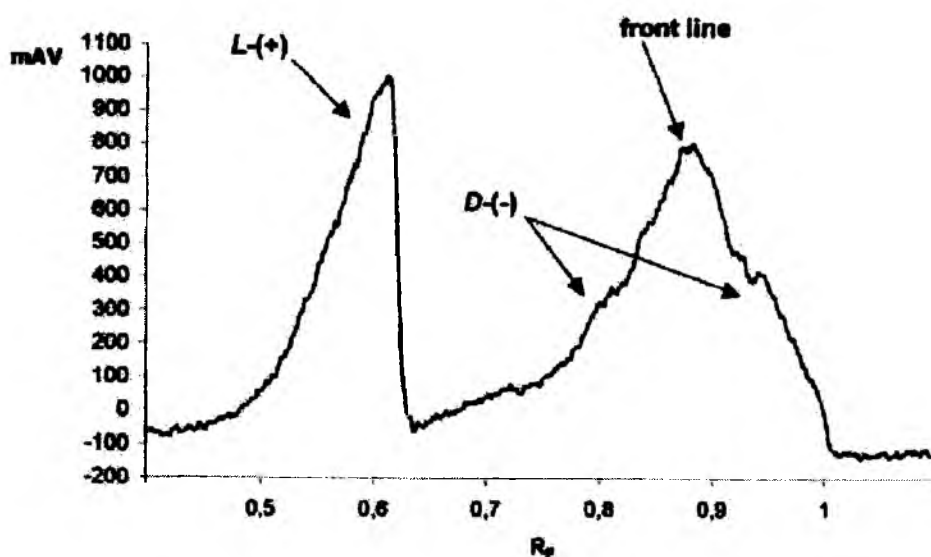
(c)

Rys. 37. Wideoskany chromatogramów otrzymanych po rozpuszczeniu kwasu *L*-(+)-mlekowego w ciekłych układach (a) etanol-woda 7:3 (v/v), (b) etanol-lodowaty kwas octowy 7:3 (v/v), (c) etanol-bufor zasadowy, pH = 9, 7:3 (v/v), dla roztworów przechowywanych przez okres 5 dni w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Na wszystkie punkty startowe przedstawionych chromatogramów наносono jednakowe ilości ($5\mu\text{l}$) poszczególnych roztworów o jednakowych stężeniach 50 g l^{-1} ($5.55 \times 10^{-1}\text{ mol l}^{-1}$) [148]

Na przedstawionych na rys. 37 chromatogramach enancjomer $D(-)$ kwasu mlekowego widoczny jest w postaci ciemnej plamki tuż poniżej czoła fazy ruchomej, natomiast enancjomer $L(+)$ znajduje się w górnej części podłużnego „ogona”.

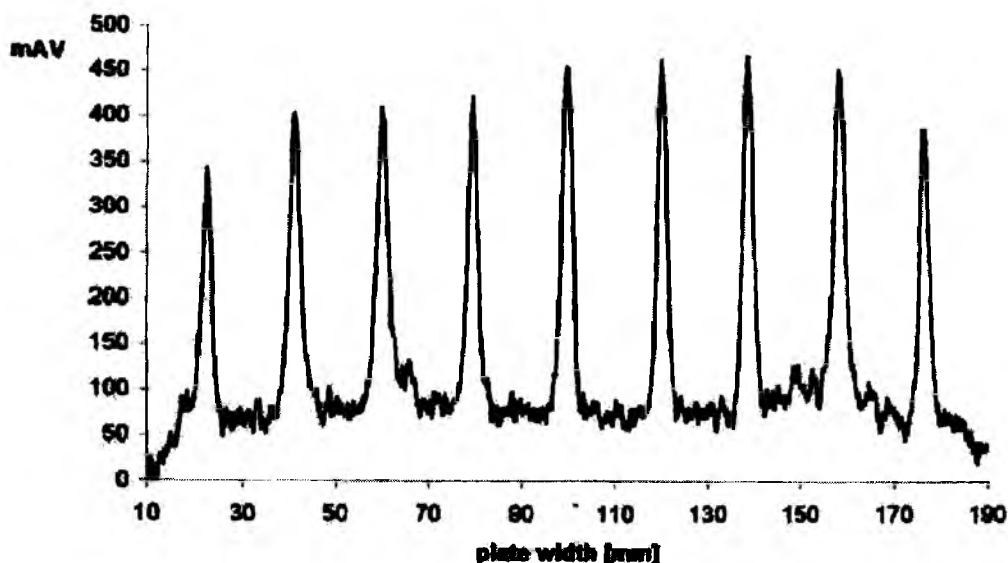
Na rys. 38 przedstawiono densytogram ilustrujący rozdział enancjomerów L i D kwasu mlekowego, typowy dla próbki kwasu $L(+)$ -mlekowego rozpuszczonej w każdym z trzech rozpuszczalników i przechowywanej w roztworze przez pewien okres czasu. Taki densytogram ma dwie istotne cechy:

- ♦ widoczny jest na nim pełen rozdział enancjomerów L i D kwasu mlekowego,
- ♦ pasmo kwasu $D(-)$ -mlekowego częściowo nakłada się na pasmo substancji wymytych z płytki chromatograficznej i obecnych w czole fazy ruchomej.



Rys.38. Typowy densytogram przedstawiający rozdzielone enancjomery L i D kwasu mlekowego rozpuszczonego w rozpuszczalniku o składzie etanol-woda 7:3 (v/v) i przechowywanego w roztworze, w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ przez okres 5 dni. Widoczny jest praktycznie pełny rozdział obu enancjomerów L i D , przy czym pasmo kwasu $D(-)$ -mlekowego częściowo nakłada się na zanieczyszczenia obecne w czole fazy ruchomej

Celem jeszcze lepszej wizualizacji obecności kwasu $D(-)$ -mlekowego płytkę chromatograficzną zeskanowano prostopadle do kierunku jej rozwijania, tuż poniżej linii czoła fazy ruchomej, tj. na tej wysokości, na której znajdowały się pasma kwasu $D(-)$ -mlekowego. Rysunek 38 przedstawia profile stężeniowe kwasu $D(-)$ -mlekowego różnych linii tak, jak pojawiały się one tuż pod czołem fazy ruchomej na chromatogramie.



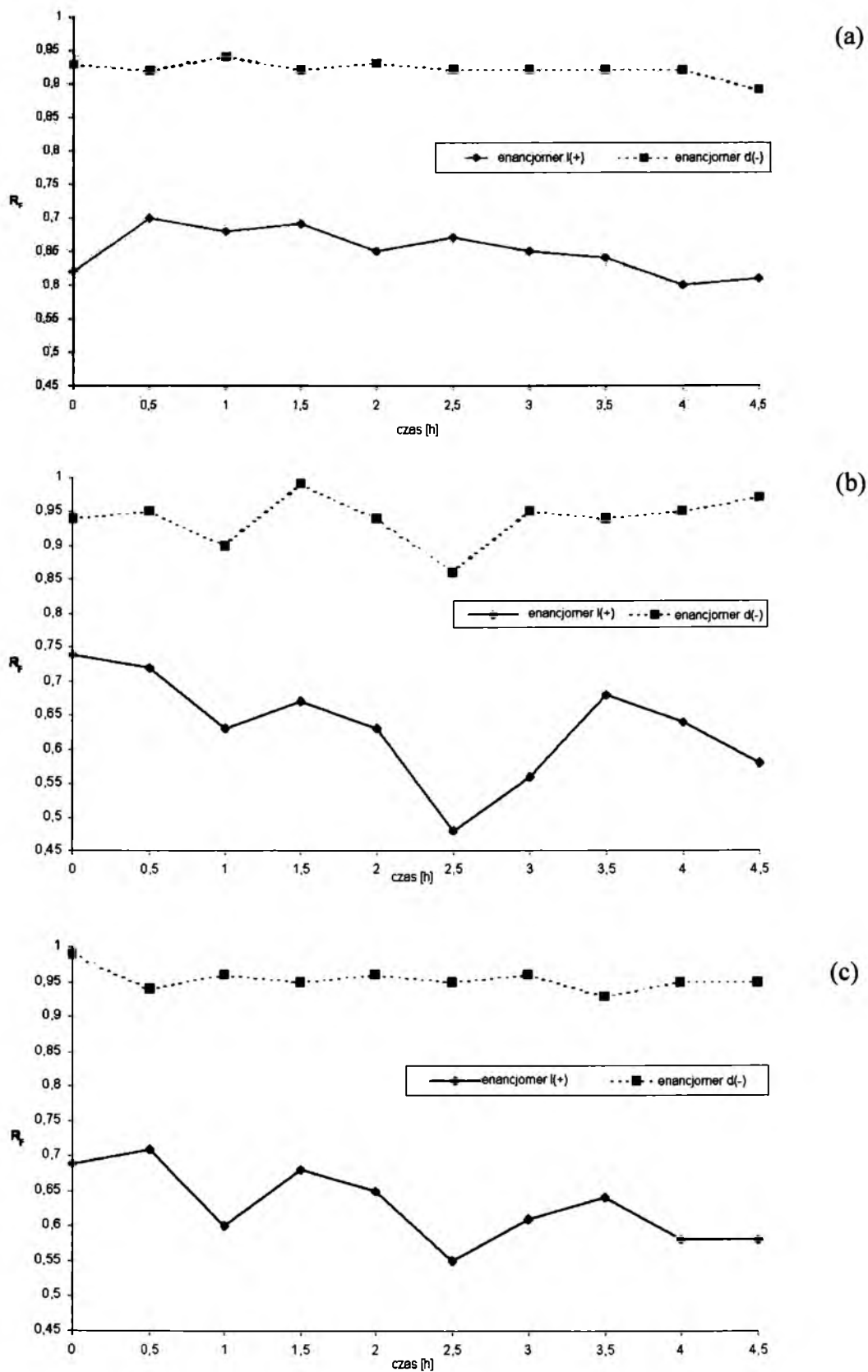
Rys. 39 Densytogram zarejestrowany w kierunku prostopadłym do kierunku rozwijania chromatogramu z Rys.1.a, zarejestrowany na wysokości pasma kwasu *D*-(-)-mlekowego. Analogiczne densytogramy uzyskano dla chromatogramów przedstawionych na Rys.37.b i 37.c

Tak więc analiza chromatograficzna roztworów kwasu *L*-(+)-mlekowego w rozpuszczalnikach wodnych, przechowywanych przez pewien okres czasu w temperaturze $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ jednoznacznie wykazała, iż badany kwas ulega w takich warunkach konwersji chiralnej. Świadczą o tym poszczególne, uzyskane w przeprowadzonych badaniach chromatogramy, które na rys. 37-39 przedstawiono w postaci wideoskanów i densytogramów. Uzyskane wyniki są bowiem identyczne z wynikami przedstawionymi w pracy Cecchi'ego i współpracowników, dotyczącej chiralnego rozdzielenia antymerów kwasu mlekowego, i to zarówno pod względem ogólnego obrazu chromatogramów, jak i pod względem współczynnika retardacji (R_F) obu rozdzielonych antymerów.

Po wykazaniu, iż kwas *L*-(+)-mlekowy rozpuszczony w przebadanych rozpuszczalnikach rzeczywiście ulega konwersji chiralnej, postanowiono znaleźć chromatograficzną odpowiedź na kolejne pytanie o to, czy obserwowana konwersja posiada charakter oscylacyjny. W tym celu naniesiono na odpowiednie wykresy wartości współczynnika retardacji (R_F) kwasu *D*-(-)- i *L*-(+)-mlekowego, uzyskiwane dla badanych próbek przez okres 4,5 godziny, analizując te próbki techniką chiralnej chromatografii cienkowarstwowej w odstępach półgodzinnych. Wykresy te zostały przedstawione na rys. 40.

W tym miejscu należy zwrócić uwagę na to, że kwas *D*-(-)-mlekowy był obecny nawet na chromatogramach świeżo sporządzonych próbek kwasu *L*-(+)-mlekowego. Niemniej eksperyment chromatograficzny nie jest w stanie jednoznacznie rozstrzygnąć, czy

racemizacja kwasu *L*-(+)-mlekowego zachodzi natychmiast po rozpuszczeniu tego związku w danym rozpuszczalniku, czy też dopiero w układzie chromatograficznym. Prawdopodobnym wydaje się, iż oddziaływania międzycząsteczkowe między chiralnym analitem i absorbentem mogą przyspieszać proces chiralnej konwersji, który przede wszystkim zachodzi poza układem chromatograficznym.



Rys. 40. Zależność wartości współczynnika retardacji (R_F) od czasu przechowywania próbek w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ dla kwasu L-(+)-mlekowego rozpuszczonego odpowiednio w rozpuszczalnikach (a) etanol-woda 7:3 (v/v), (b) etanol-lodowaty kwas octowy 7:3 (v/v), (c) etanol-bufor zasadowy, pH = 9, 7:3 (v/v)

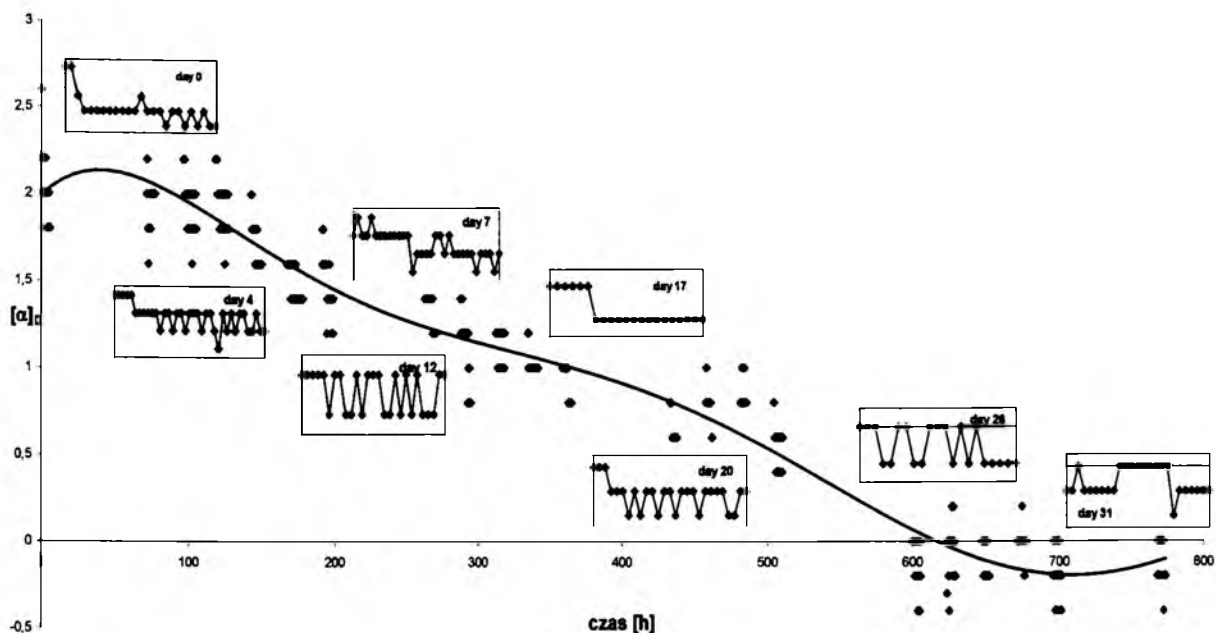
Rysunki 40a-c przedstawiają oscylacyjne zmiany współczynnika opóźnienia (R_F) kwasu $L-(+)$ - i $D-(-)$ -mlekowego. Obserwowane oscylacje najprawdopodobniej odzwierciedlają strukturalną konwersję kwasu $L-(+)$ -mlekowego do antymeru $D-(-)$ i odwrotnie, ponieważ błąd eksperymentalny dla wartości R_F z reguły w przypadku związków nie ulegających konwersji chiralnej nie przekracza 0,02 bezwymiarowej jednostki R_F .

Wartości współczynnika R_F kwasu mlekowego w roztworze etanolowo-wodnym oscylowały w granicach od $0,60 \pm 0,02$ do $0,70 \pm 0,02$ dla kwasu $L-(+)$ -mlekowego i od $0,89 \pm 0,02$ do $0,94 \pm 0,02$ dla kwasu $D-(-)$ -mlekowego. W przypadku roztworów sporządzonych w mieszaninie wody i kwasu octowego przedziały oscylacji wynosiły od $0,48 \pm 0,02$ do $0,74 \pm 0,02$ dla kwasu $L-(+)$ -mlekowego i od $0,86 \pm 0,02$ do $0,97 \pm 0,02$ dla kwasu $D-(-)$ -mlekowego. Dla roztworu etanol-bufor zasadowy przedziały te sięgały od $0,55 \pm 0,02$ do $0,71 \pm 0,02$ dla kwasu $L-(+)$ -mlekowego i od $0,93 \pm 0,02$ do $0,97 \pm 0,02$ dla kwasu $D-(-)$ -mlekowego.

Amplitudy wartości współczynnika R_F dla kwasu $L-(+)$ -mlekowego w trzech różnych roztworach były wyższe, niż dla antymeru $D-(-)$, co jest spowodowane bliskością tego ostatniego względem czoła fazy ruchomej. Większa ruchliwość w układzie chromatograficznym kwasu $D-(-)$ -mlekowego (tj. stosunkowo wyższe wartości współczynnika R_F dla tego kwasu) jest dowodem na to, że jego zdolność do chelatowania jonów miedzi (II) jest mniejsza, niż enancjomeru $L-(+)$ (czyli $K_D < K_L$). Tak więc dzięki zastosowaniu chiralnej chromatografii cienkowarstwowej udało się nie tylko wykazać zdolność kwasu $L-(+)$ -mlekowego do ulegania konwersji chiralnej, ale również zademonstrowano oscylacyjny charakter tego procesu.

7.4.1.2. Polarymetria

Badania zmian skręcalności właściwej kwasu $L-(+)$ -mlekowego były przeprowadzone w trzech seriach doświadczeń. W pierwszym doświadczeniu zmiany skręcalności właściwej roztworu kwasu $L-(+)$ -mlekowego w roztworze etanolowo-wodnym, przechowywanym przez 32 dni w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$, były rejestrowane w sposób nieciągły prawie codziennie, po kilka godzin dziennie w 15-minutowych odstępach czasu. Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 41.

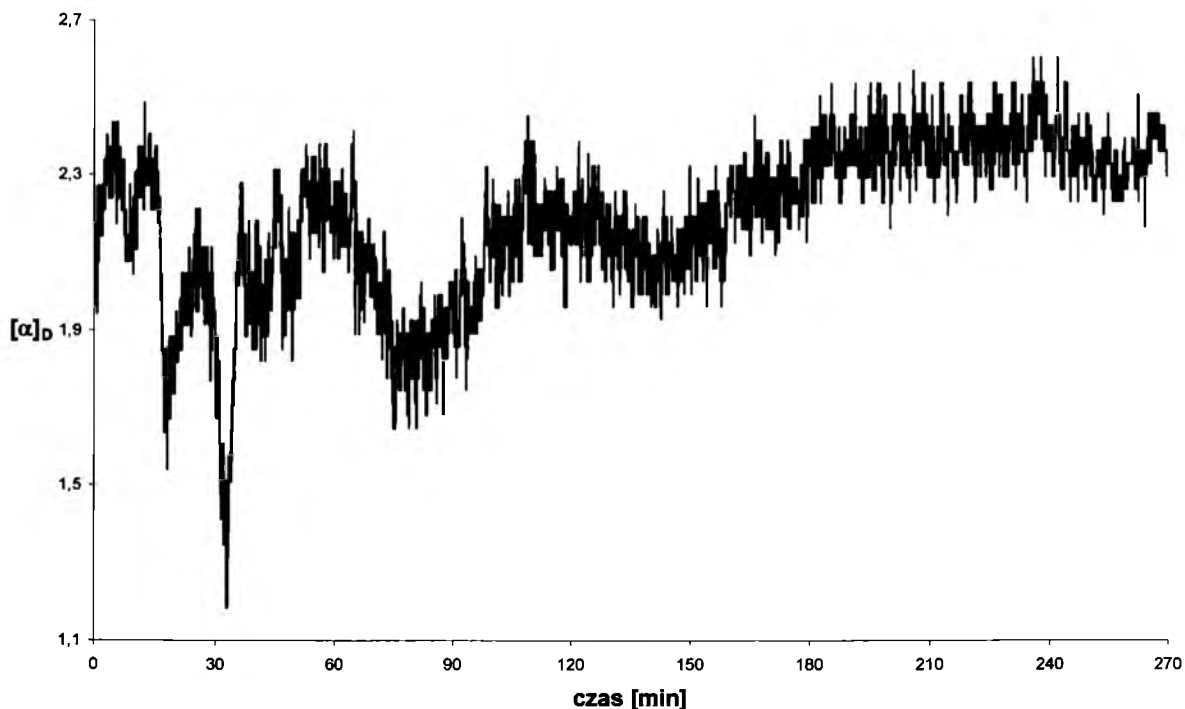


Rys. 41. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla kwasu *L*-(+)-mlekowego rozpuszczonego w rozpuszczalniku dwuskładnikowym etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3 w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Główny kierunek zmian jest zaznaczony linią ciągłą, a wykresy w „okienkach” obrazują zmiany zachodzące w wybranych dniach przeprowadzanego eksperymentu

Obraz, jaki wyłania się z rysunku 41 ujawnia następujące prawidłowości:

- ❖ zmiany skręcalności właściwej były z natury oscylacyjne, co jest najlepiej widoczne w „okienkach” zamieszczonych na tym rysunku;
- ❖ długoterminowy trend zmian wartości skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ wskazuje na postępujący proces racemizacji kwasu *L*-(+)-mlekowego (wartości $[\alpha]_D$ zmierzają do zera).

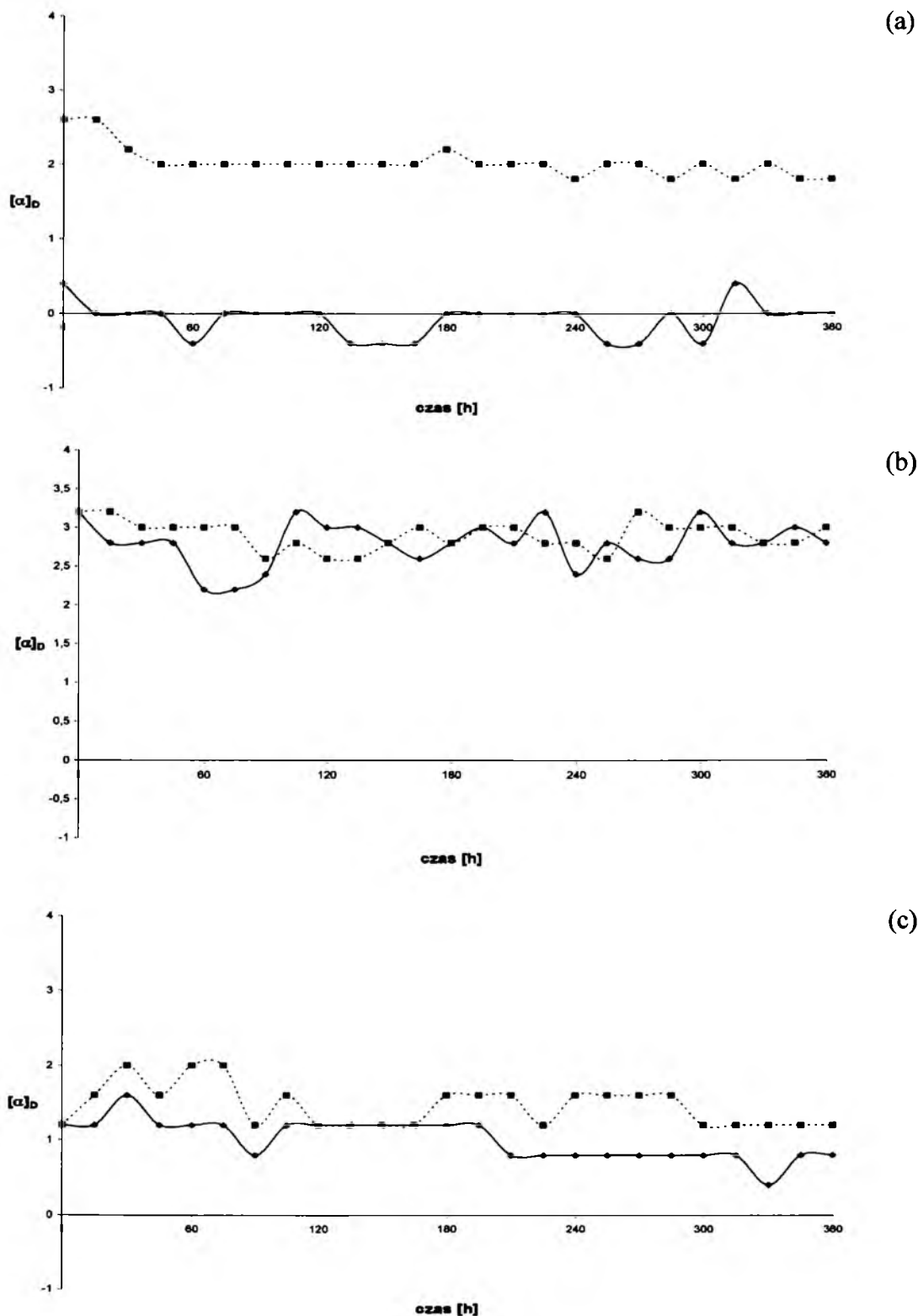
Do pełnej racemizacji kwasu *L*-(+)-mlekowego dochodzi po około 600 godzinach przechowywania roztworu. W drugim eksperymencie polarymetrycznym rejestrację oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej przeprowadzono w sposób ciągły, również w temperaturze 22°C przez pierwsze 4,5 godziny od chwili sporządzenia roztworu kwasu *L*-(+)-mlekowego w rozpuszczalniku etanolowo-wodnym. Uzyskany wynik przedstawiono na rys. 42.



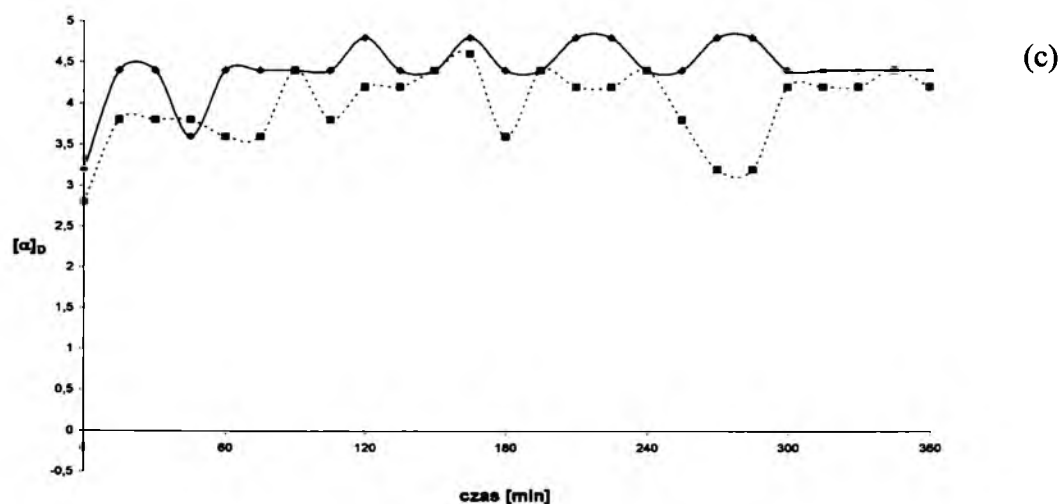
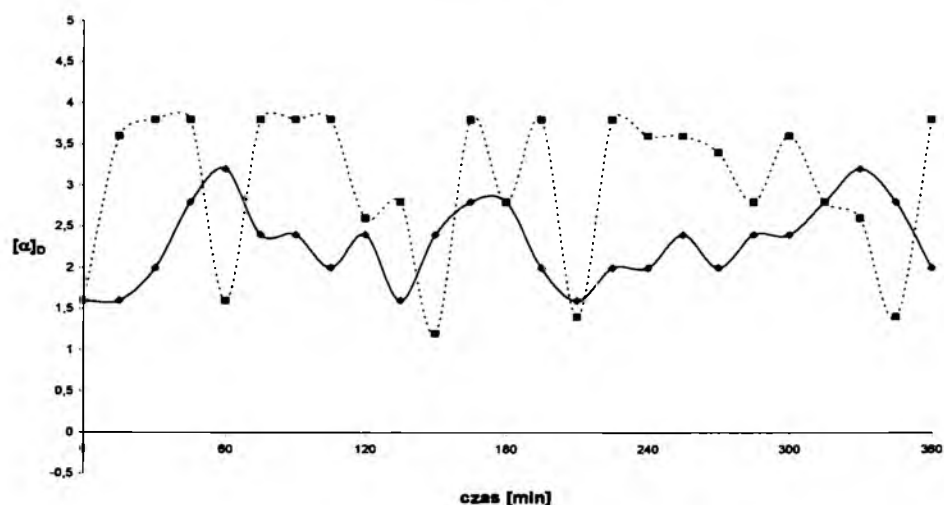
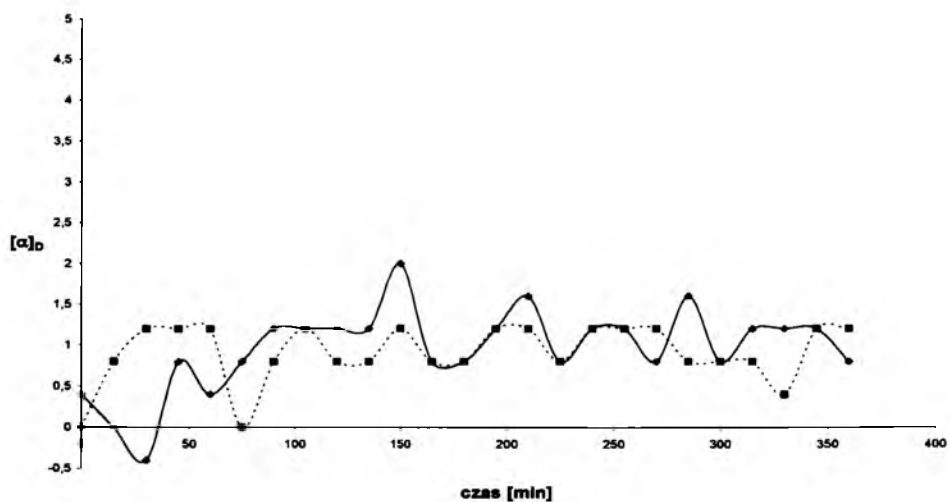
Rys. 42. Ciągła rejestracja oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu w temperaturze $22 \pm 2^\circ\text{C}$ dla roztworu kwasu *L*-(+)-mlekowego w rozpuszczalniku dwuskładnikowym etanol-woda, w stosunku objętościowym 7:3

Wynik ciągłej rejestracji zmian skręcalności właściwej roztworu kwasu *L*-(+)-mlekowego w funkcji czasu stanowi jeszcze dobitniejszy dowód na to, iż zmiany te miały charakter oscylacyjny. Dodatkowo potwierdza on nasze przypuszczenie, iż obserwowane oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ są rezultatem oscylacyjnej konwersji chiralnej badanego kwasu.

W trzeciej serii doświadczeń skręcalność właściwa $[\alpha]_D$ roztworów kwasu *L*-(+)-mlekowego była mierzona w sposób nieciągły przez okres 6 godzin w dwóch temperaturach: $9 \pm 1^\circ\text{C}$ i $22 \pm 1^\circ\text{C}$. W każdej temperaturze przeprowadzano dwa równoległe pomiary: jeden dla roztworu poddawanego działaniu ultradźwięków, a drugi dla roztworu nie poddawanego temu działaniu. W żadnym z tych dwóch przypadków skręcalność właściwa nie pozostawała niezmienna w czasie. Przeciwnie, obserwowano oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej w trakcie całego trwania eksperymentu. Amplituda tych zmian była jednakże znacznie mniejsza w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$, niż w temperaturze $9 \pm 1^\circ\text{C}$. Na rys. 43a-c i 44a-c przedstawiono wyniki uzyskane w trzeciej serii doświadczeń.



Rys. 43. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla roztworów kwasu *L*-(+)-mlekowego rozpuszczonych w następujących rozpuszczalnikach: (a) etanol-woda 7:3 (v/v), (b) etanol- lodowaty kwas octowy 7:3 (v/v), (c) etanol-bufor zasadowy pH=9, 7:3 (v/v) przechowywanych w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Wyniki dla roztworów poddawanych działaniu ultradźwięków i nie poddawanych temu działaniu przedstawiono odpowiednio linią ciągłą i linią przerywaną.



Rys. 44. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla roztworów kwasu *L*-(+)-mlekowego rozpuszczonych w następujących rozpuszczalnikach: (a) etanol-woda 7:3 (v/v), (b) etanol-lodowaty kwas octowy 7:3 (v/v), (c) etanol-bufor zasadowy pH=9, 7:3 (v/v) przechowywanych w temperaturze $9 \pm 1^\circ\text{C}$. Wyniki dla roztworów poddawanych działaniu ultradźwięków i nie poddawanych temu działaniu przedstawiono odpowiednio linią ciągłą i linią przerywaną

Rejestracja zmian skręcalności właściwej w trzeciej serii prowadzonego eksperymentu polarymetrycznego miała na celu wyeksponowanie wpływu czynnika dyfuzyjnego na przebieg obserwowanego procesu, najprawdopodobniej będącego samorzutną, oscylacyjną konwersją chiralną kwasu L-(+)-mlekowego. Wpływ czynnika dyfuzyjnego starano się wyeksponować na dwa sposoby:

- ❖ poprzez obniżenie temperatury badanego roztworu, co wiąże się ze wzrostem jego lepkości ,
- ❖ poprzez porównanie przebiegu oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej roztworu mieszanego przy pomocy ultradźwięków oraz roztworu nie mieszanego.

Silny wzrost amplitudy oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ badanych roztworów, wywołany obniżeniem ich temperatury i jednoczesnym wzrostem ich lepkości wskazuje na bardzo istotną rolę dyfuzji w badanym procesie, jak to ma bardzo często miejsce w przypadku różnych reakcji oscylacyjnych.

Zastosowanie ultradźwięków do mieszania badanych roztworów miało na celu ułatwienie dyfuzji cząsteczek kwasu mlekowego w tych roztworach, a przez to obniżenie wpływu czynnika dyfuzyjnego na proces konwersji chiralnej i być może częściowe stłumienie, albo nawet wyeliminowanie zjawiska oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej. Tymczasem kształt krzywych przedstawionych zwłaszcza na rysunku 44a-c pozwala wnioskować, że mieszanie badanych próbek ultradźwiękami nie wpływa znacząco na amplitudę skręcalności właściwej badanych roztworów.

Tak więc wyniki badań przeprowadzonych techniką chiralnej chromatografii cienkowsarstwowej oraz badań polarymetrycznych zdają się jednoznacznie wskazywać na to, iż kwas L-(+)-mlekowy może ulegać oscylacyjnej konwersji chiralnej, po uprzednim rozpuszczeniu w zawierających wodę rozpuszczalnikach niskocząsteczkowych.

7.4.2. Badanie polikondensacji kwasu mlekowego

7.4.2.1. Achiralna wysokosprawna chromatografia cieczowa

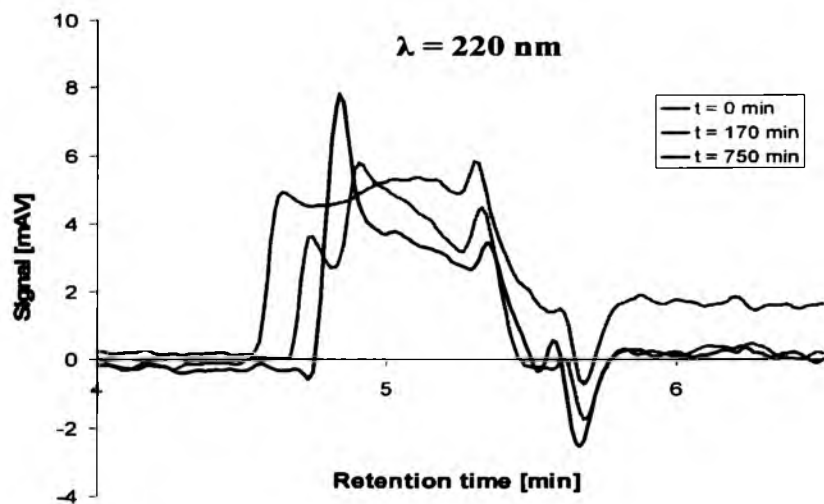
Kolejnym ważnym krokiem badawczym było przeanalizowanie dynamiki procesu polikondensacji kwasu *L*-mlekowego, ze względu na jego szczególne znaczenie biologiczne. Do badań zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową z trzema różnymi rodzajami detekcji z: matrycą fotodiodową (HPLC-DAD), z detektorem rozproszenia światła (ELSD) oraz ze spektrometrią mas (MS). Wyniki otrzymane przy użyciu detektora ELSD (rysunek 45c i 46c) są w pewnym sensie lepszymi wskaźnikami dynamiki układu aniżeli wyniki otrzymane przy użyciu detektora DAD. ELSD jest bowiem detektorem uniwersalnym, dla którego intensywność sygnału jest proporcjonalna do masy cząsteczkowej analitu. Detektor DAD funkcjonuje na zasadzie absorpcji promieniowania UV. Kwas mlekowy i jego możliwe produkty polikondensacji przeważnie nie posiadają grup chromoforowych absorbujących promieniowanie UV, jednakże detektor DAD może również reagować na różnice współczynnika załamania światła związków obecnych w wycieku z kolumny chromatograficznej. Obiektem badań były świeżo sporządzone roztwory kwasu *L*-mlekowego w czystym acetonitrylu i w dwuskładnikowym rozpuszczalniku etanolowo-wodnym (7:3, v/v), które następnie przechowywano przez okres 900 minut (ACN) oraz 400 minut (70% EtOH) w temperaturze 22°C, w szczelnie zamkniętych szklanych fiolkach.

Na rysunku 45 przedstawiono chromatogramy kwasu *L*-mlekowego rozpuszczonego w czystym acetonitrylu, które zostały zarejestrowane dla świeżo sporządzonej próbki oraz dla próbki przechowywanej odpowiednio przez okres 0, 170 i 750 minut. Rysunek 46 przedstawia chromatogramy dla próbki kwasu *L*-mlekowego rozpuszczonego w 70% wodnym roztworze etanolu i przechowywanego przez okres 0, 70 i 80 minut. Zaprezentowane chromatogramy zostały zarejestrowane przy użyciu detektorów DAD oraz ELSD.

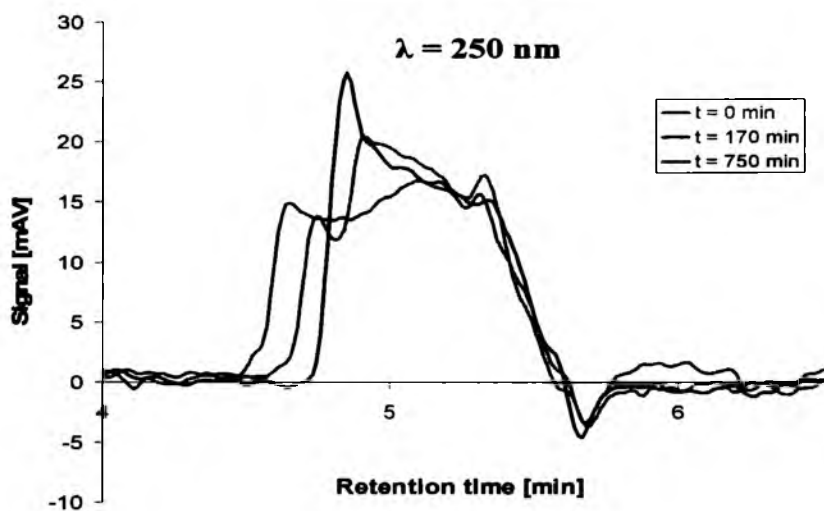
Chromatogramy kwasu *L*-mlekowego rozpuszczonego w mieszaninie dwuskładnikowej etanol-woda (7:3, v/v) zarejestrowane przy długościach fali 220 i 250 nm przy użyciu detektora DAD oraz ELSD przedstawiają zadowalający, lecz niepełny rozdział (nie zawsze do linii podstawowej). Wysokości pików chromatograficznych uznano za proporcjonalne do stężeń poszczególnych rozdzielonych indywiduów chemicznych. W przypadku próbki, w której rozpuszczalnikiem był acetonitryl można zauważyć brak pełnego rozdziału pasm pomimo zastosowania tego samego układu chromatograficznego, co w przypadku próbki rozpuszczonej w 70% etanolu. Chromatogramy dla kwasu *L*-mlekowego

rozpuszczonego w acetonitrylu oraz w rozpuszczalniku etanolowo-wodnym, stanowiące swoiste „odciski palca”, znacząco różnią się między sobą. Obserwowane rozbieżności prawdopodobnie wynikają z różnych zdolności do tworzenia wiązania wodorowego pomiędzy acetonitrylem a kwasem mlekowym z jednej strony oraz 70% etanolem a kwasem mlekowym z drugiej. Ze względu na większą tendencję do tworzenia się wiązań wodorowych między wodą i etanolem a kwasem mlekowym niż między acetonitrylem a kwasem mlekowym na chromatogramach tych pierwszych roztworów można zaobserwować profile stężeniowe bogatsze w piki rozdzielonych produktów kondensacji. Jednakże zastosowane w chromatograficznym eksperymencie warunki nie pozwalają na pełny rozdział różnorodnych rodzajów oligomerów.

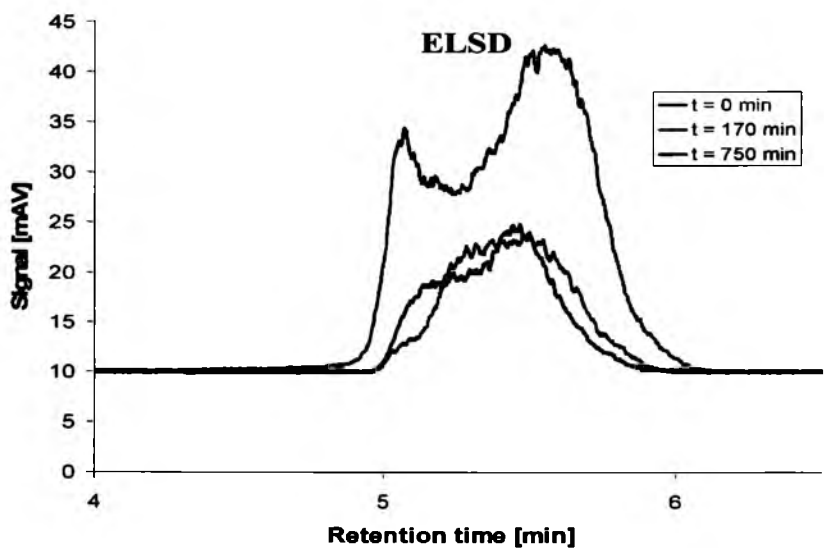
(a)



(b)

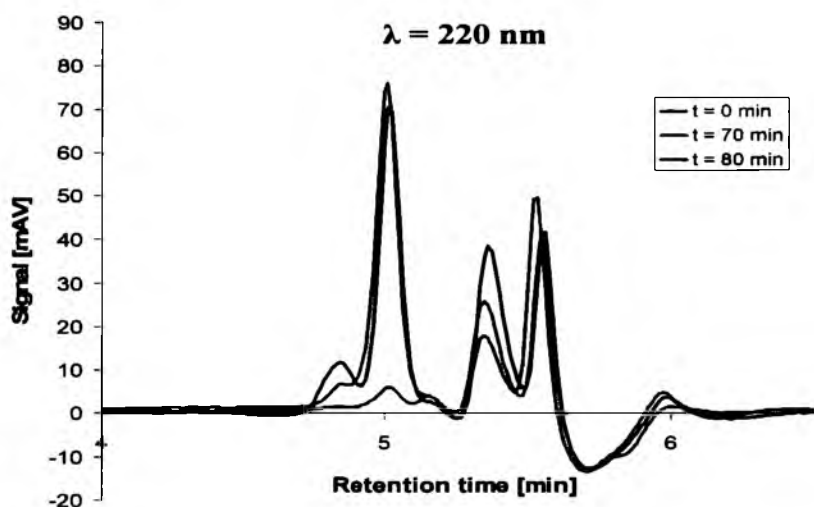


(c)

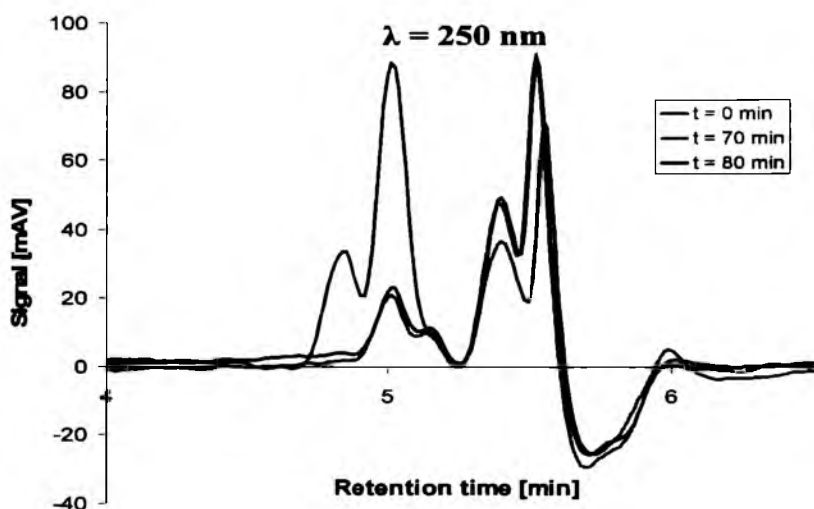


Rys.45. Chromatograficzne profile stężeniowe kwasu *L*-mlekowego rozpuszczonego w ACN w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ dla czasu przechowywania 0, 170, i 750 min, zarejestrowane przy użyciu detektora DAD o długości fali (a) 220 nm, (b) 250 nm, i (c) detektora ELSD.

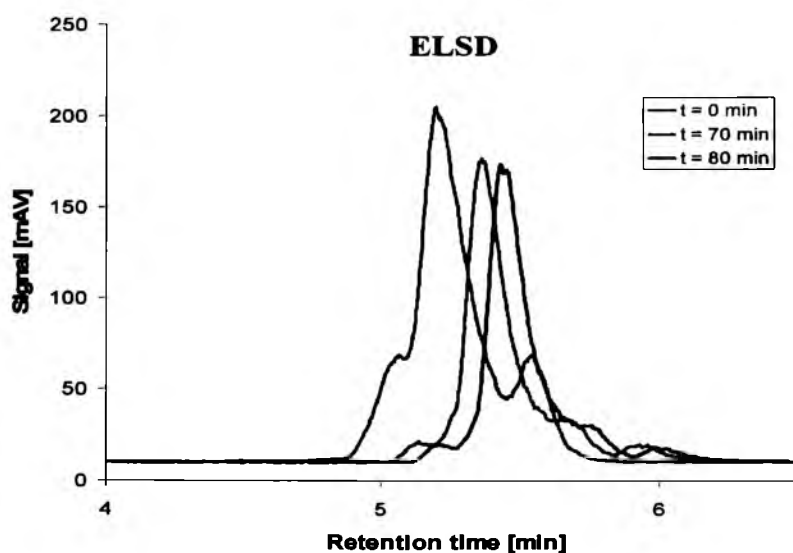
(a)



(b)



(c)

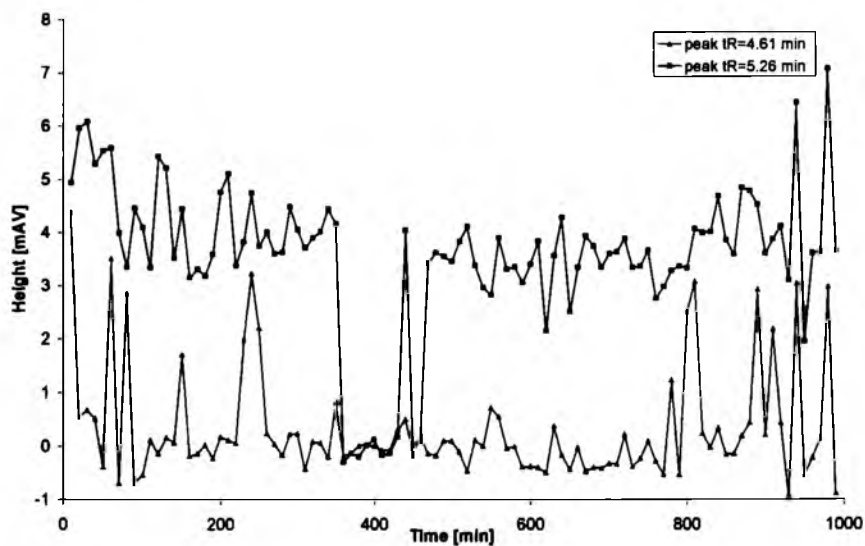


Rys.46. Chromatograficzne profile stężeniowe kwasu *L*-mlekowego rozpuszczonego w 70% EtOH w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ dla czasu przechowywania 0, 70, i 80 min, zarejestrowane przy użyciu detektora DAD o długości fali (a) 220 nm, (b) 250 nm, i (c) detektora ELSD.

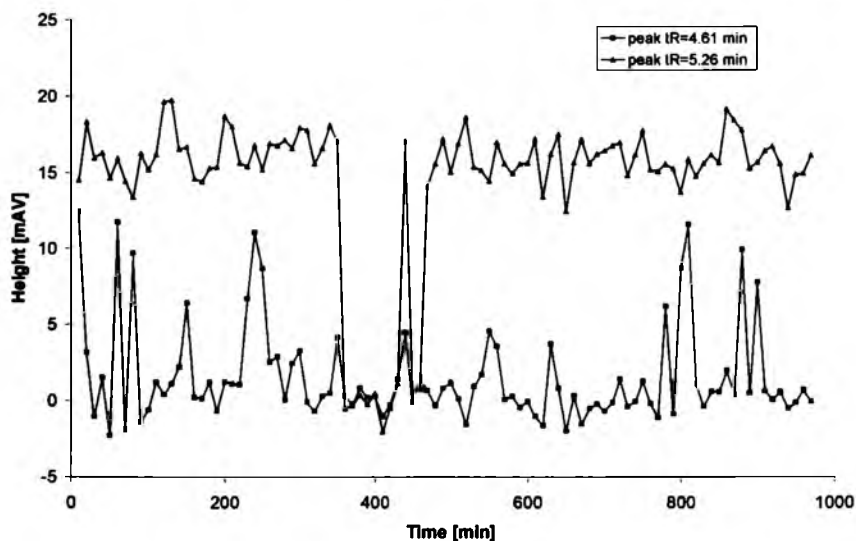
W celu wizualizacji zmian, zachodzących w roztworze kwasu *L*-mlekowego rozpuszczonego w acetonitrylu i 70% etanolu, sporządzono wykresy przedstawiające zależność wysokości pików w funkcji czasu (rysunki 47 i 48).

Pik kwasu mlekowego rozpuszczonego w acetonitrylu oraz produkt jego starzenia zarejestrowane przy użyciu detektora DAD przy długościach fali 220 i 250 nm (rysunkiu 47a i 47b) miały czasy retencji odpowiednio 4.61 min. oraz 5.26 min. Te same piki zarejestrowane przy użyciu detektora ELSD na rysunku 47c plasują się przy czasach retencji odpowiednio 5.07 i 5.57min. Różnice w czasach retencji są spowodowane szeregowym połączeniem detektorów DAD i ELSD.

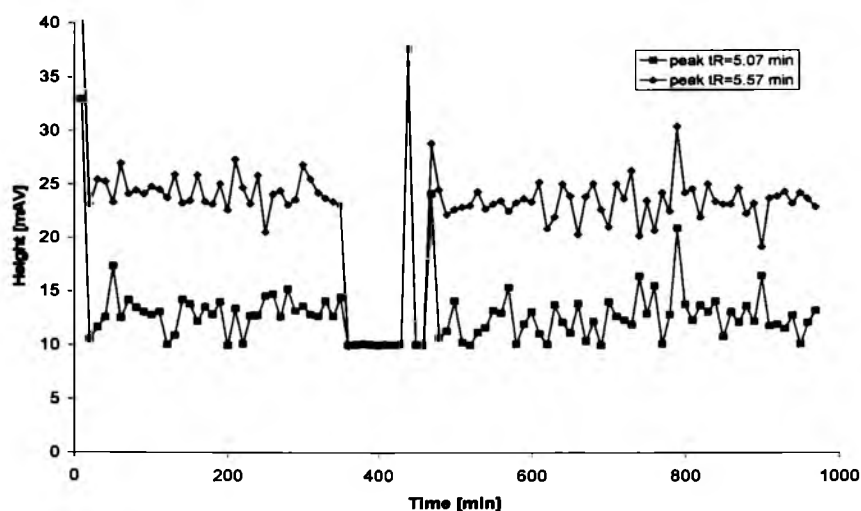
Krzywa opisująca zmianę wysokości pików o czasie retencji $t_R=5.26$ min (DAD) oraz $t_R=5.57$ min (ELSD) na rysunku 47a-c pomiędzy 360 a 460 minutą przechowywania próbki ulega gwałtownemu obniżeniu, a amplituda oscylacji zmniejsza się. Obserwowane zjawisko można przypisać tymczasowemu „zaniknięciu” produktu oligomeryzacji ze środowiska reakcji albo poprzez dysocjację oligomeru do niższych indywiduów, lub poprzez utworzenie wyższych oligomerów.



(a)

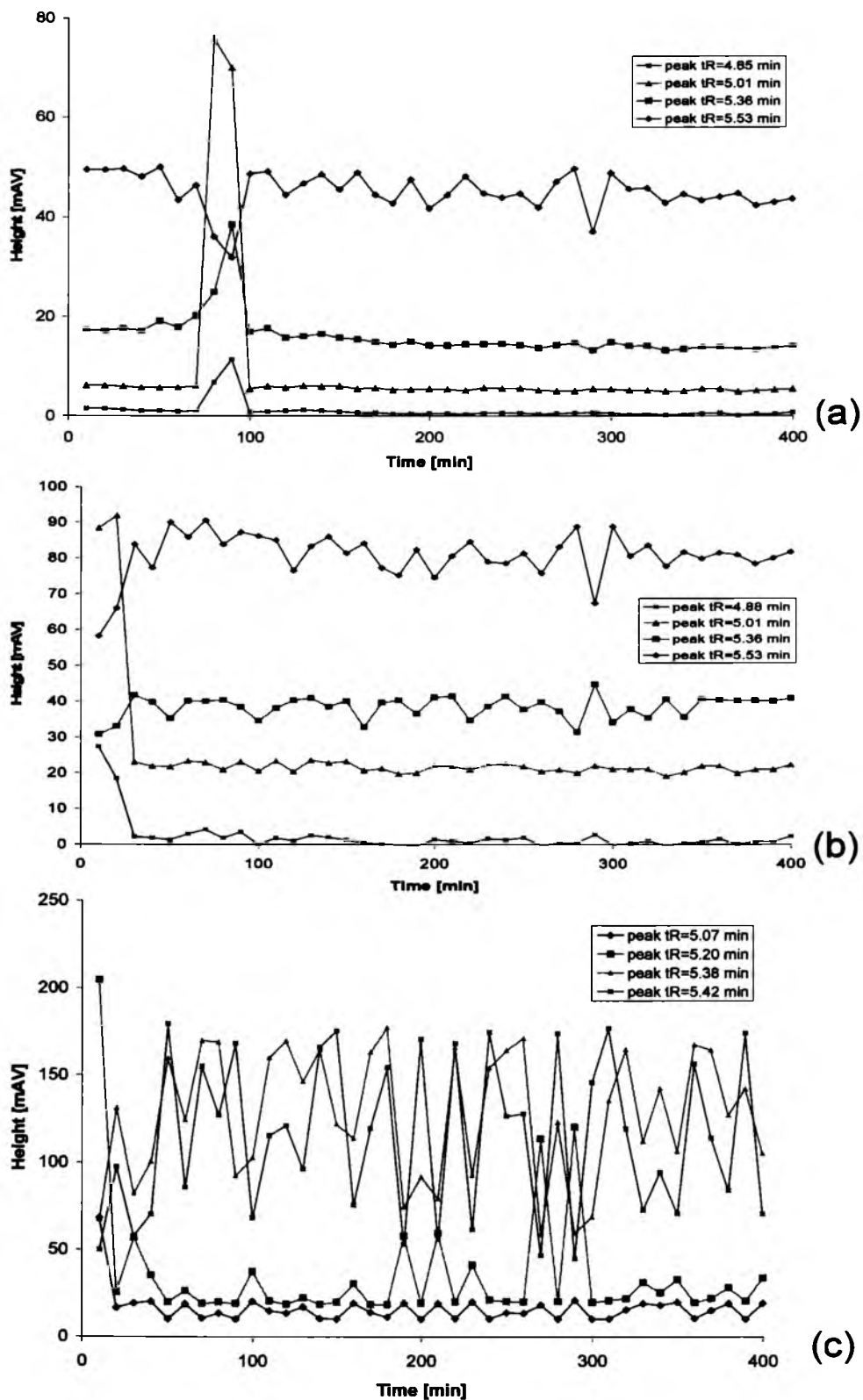


(b)



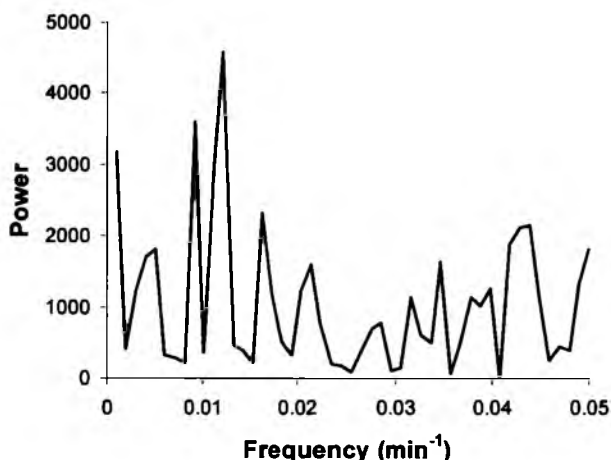
(c)

Rys.47. Oscylacyjne zmiany wysokości pików dla próbki kwasu L-mlekowego rozpuszczonego w ACN i przechowywanej temperaturze 22°C. (a) Detektor DAD, długość fali $\lambda = 220$ nm; (b) detektor DAD, długość fali $\lambda = 250$ nm; (c) detektor ELSD. Krzywe na wykresach (a) i (b) dotyczą pików o czasach retencji $t_R = 4.61$ i 5.26 min. Krzywe na wykresie (c) dotyczą pików o czasach retencji $t_R = 5.07$ i 5.57 min.



Rys.48 zmiany wysokości pików dla próbki kwasu L-mlekowego rozpuszczonego w 70% EtOH i przechowywanej temperaturze 22°C. (a) detektor DAD, długość fali $\lambda = 220$ nm; (b) detektor DAD, długość fali $\lambda = 250$ nm; (c) detektor ELSD. Krzywe na wykresach (a) i (b) dotyczą pików o czasach retencji $t_R = 4.85$, 5.01, 5.36 i 5.53 min; krzywe na wykresie (c) dotyczą pików o czasach retencji $t_R = 5.07$, 5.20, 5.38, i 5.42 min.

Aby ocenić, czy krzywe przedstawione na rysunku 47 zawierają istotny i okresowo pojawiający się składnik, użyto szybkiej transformacji Fouriera do skonstruowania widm mocy. Każde z wygenerowanych widm mocy wykazuje bardzo wysoki pik przy zerowej częstotliwości, ale piki te zostały usunięte z odpowiednich wykresów. Przykładowe widmo mocy wygenerowane dla danych z rysunku 47b zostało przedstawione na rysunku 49. Dwa najwyższe piki pojawiają się tu w okolicach częstotliwości równej $0,01 \text{ min}^{-1}$, co oznacza okresowość reakcji równą około 100 minut.



Rys.49. Widmo mocy obliczone dla serii zmiennych wysokości pików chromatograficznego o czasie retencji $t_R = 4.61 \text{ min}$ dla kwasu *L*-mlekowego rozpuszczonego w acetonitrylu. Pik został zarejestrowany przy pomocy detektora DAD przy długości fali $\lambda = 250 \text{ nm}$.

Przykładowe widma mocy analogiczne wygenerowane dla danych graficznie przedstawionych na rysunku 48 zostały przedstawione na rysunku 50. Udało się na ich podstawie ustalić, że okresowość reakcji w przypadku rozpuszczalnika etanolowo-wodnego wynosi około 30 minut.

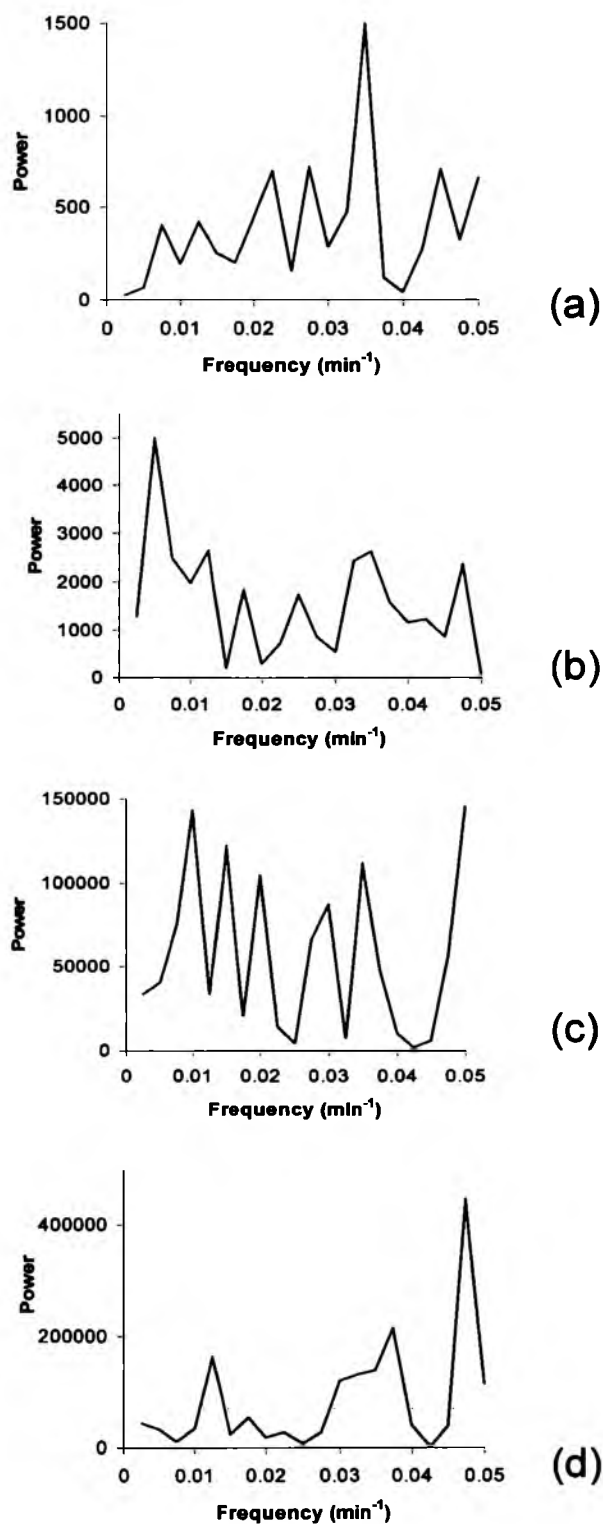
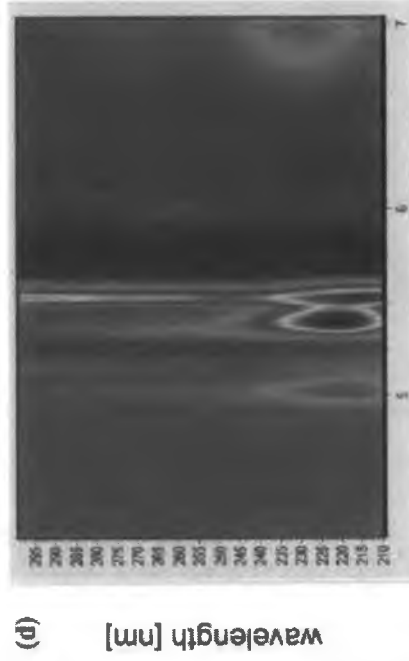
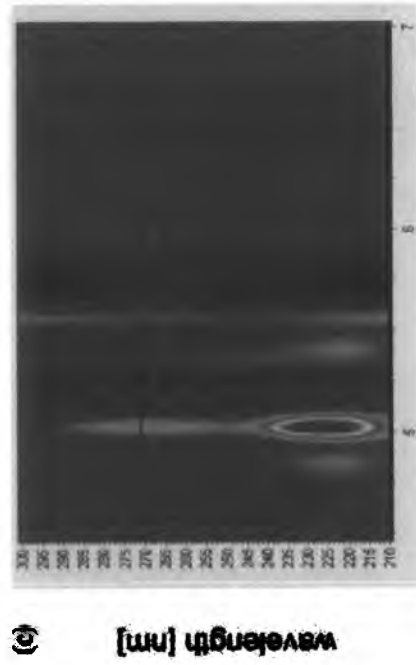
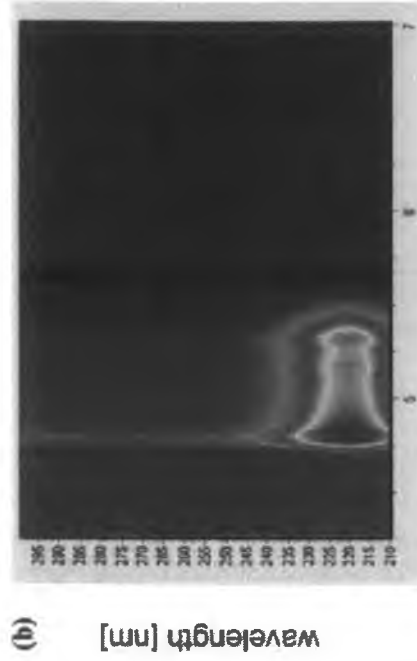
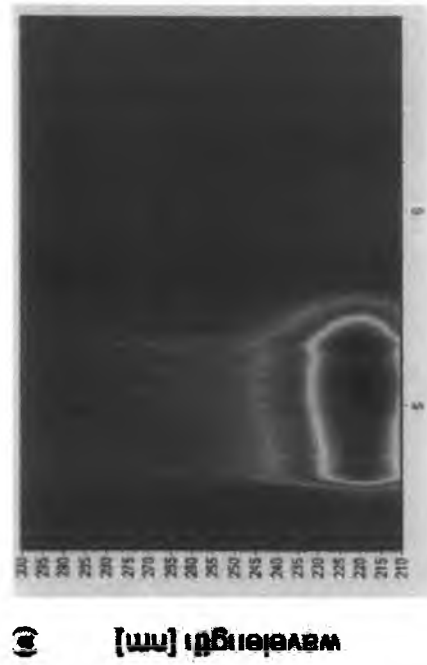


Fig.50. Widma mocy obliczone dla serii zmiennych wysokości pików chromatograficznych kwasu *L*-mlekowego rozpuszczonego w 70% etanolu przy rejestracji (a) i (b) detektorem DAD o długości fali $\lambda = 250$ nm, (c) i (d), detektorem ELSD. Czasy retencji odpowiednich pików: $t_R =$ (a) 5.36 min, (b) 5.53 min, (c) 5.38 i (d) 5.42 min.

Najwyższy pik na rysunku 50a znajduje się przy częstotliwości 0.035 min^{-1} . Częstotliwość ta odpowiada w przybliżeniu powtarzalności okresowej około 30 minut, którą można zaobserwować dla piku o czasie retencji $t_R=5.36 \text{ min}$ na rysunku 48b. Widmo mocy dla piku o czasie retencji $t_R=5.53 \text{ min}$ (rys.50b) również znajduje się przy częstotliwości 0.035 min^{-1} , chociaż najwyższy pik na wykresie mocy znajduje się przy częstotliwości 0.005 min^{-1} . Rysunki 50c i 50d mają swoje maksima także przy częstotliwości około 0.035 min^{-1} .

Rysunek 51 przedstawia spektrochromatogramy świeżo przygotowanych próbek kwasu mlekowego, rozpuszczonych odpowiednio w acetonitrylu (rys.51a) i 70% etanolu (rys.51c) oraz spektrochromatogramy próbek, które przechowywano przez okres 980 minut w acetonitrylu (rys.51b) i 400 minut w 70% etanolu (rys.51d).



retention time [min]

retention time [min]

Rys. 51. Spektrochromatogramy roztworu kwasu *L*-mlekowego zarejestrowane przy pomocy detektora DAD po czasie (a) 0 minut i (b) 980 minut przechowywania w roztworze acetonitrylu, oraz (c) 0 minut i (d) 400 minut przechowywania w roztworze 70% etanolu. Temperatura przechowywania próbek: 22°C

Wyniki przedstawione na rysunku 51 świadczą o istotnych zmianach w składzie roztworów, zachodzących po kilku godzinach ich przechowywania. W próbce kwasu mlekowego rozpuszczonego w dwuskładnikowym rozpuszczalniku etanol-woda (7:3, v/v) widoczne jest pojawienie się większej liczby struktur o podwyższonych czasach retencji względem wyjściowego kwasu *L*-mlekowego, co świadczy o ich wyższych masach cząsteczkowych (Rys.51(d)).

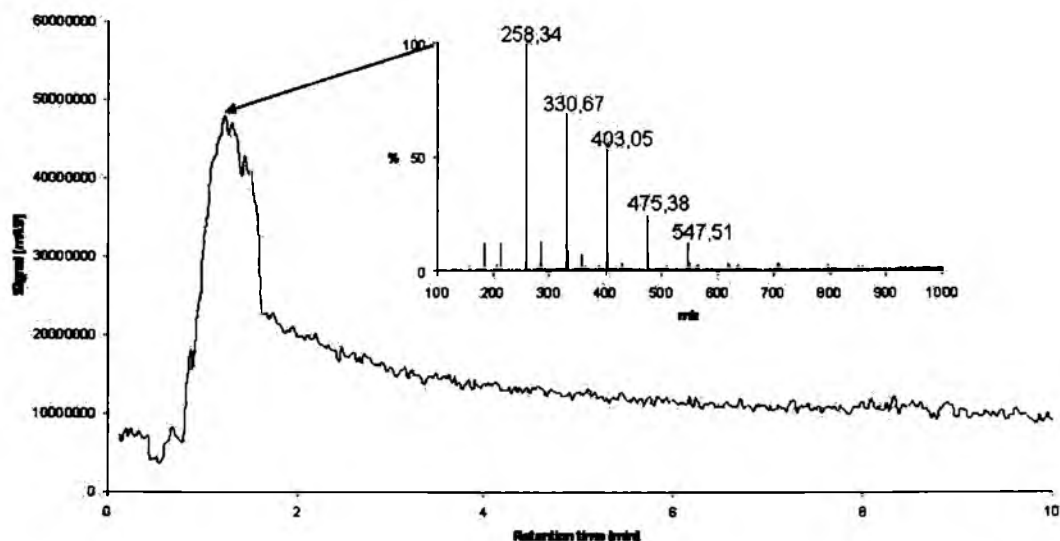
7.4.2.2. Achiralna wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją MS

Połączenie chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas zapewnia niezależne monitorowanie procesów oligomeryzacji kwasu mlekowego. Pierwszym krokiem było wstępne rozdzielenie świeżo przygotowanych, a także poddanych procesowi starzenia próbek kwasu mlekowego na kolumnie chromatograficznej. Otrzymane chromatogramy przedstawiono na rysunku 52. Każdy chromatogram dodatkowo opatrzono widmami masowymi rozdzielonych pików.

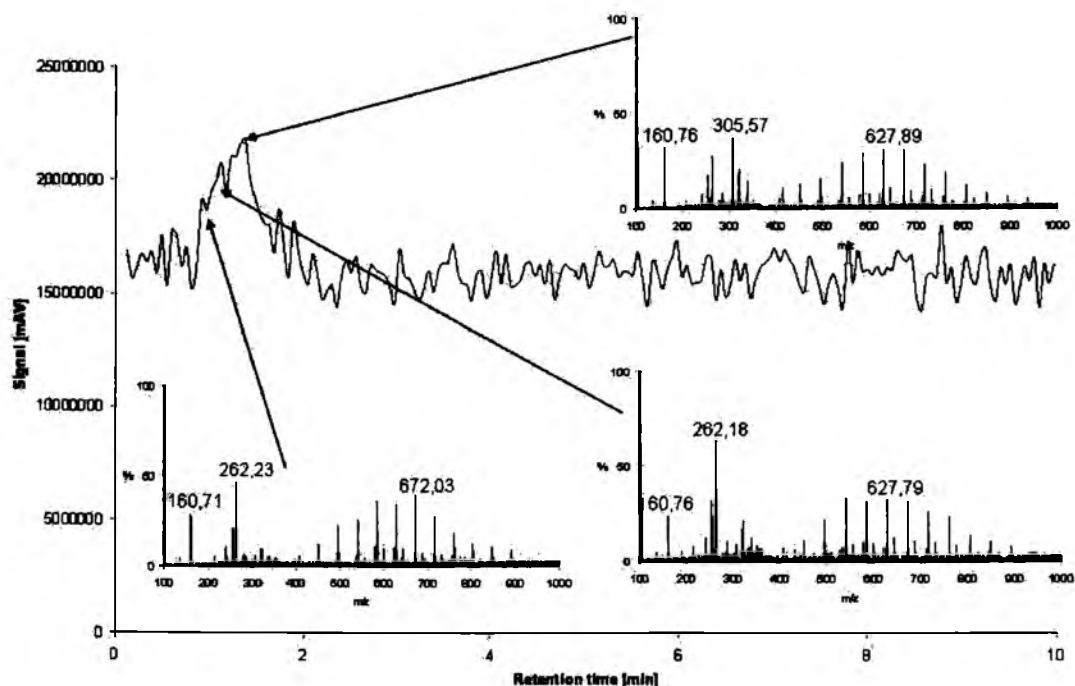
W świeżo przygotowanej próbce kwasu mlekowego rozpuszczonej w acetonitrylu (rys. 52a) widoczny jest jeden główny pik. Na odpowiednim widmie masowym dominujący pik występujący przy $m/z = 258.34$, który być może odpowiada następującej strukturze: $[LA_3 + Na + He]^+$ (gdzie LA_3 oznacza trimer kwasu mlekowego). Sygnał przy $m/z = 258.34$ jest zasadniczo nieobecny w eluacie analizowanym po 980 minutach (rys. 52b). W tym przypadku dość duża grupa sygnałów pojawia się w postaci rozkładu normalnego wokół $m/z = 627$. Sygnał przy $m/z = 627$ prawdopodobnie odpowiada kationowi $[LA_8 + Na + He]^+$.

Profil stężeniowy próbki kwasu mlekowego świeżo przygotowanej w dwuskładnikowym rozpuszczalniku etanol – woda (7:3, v/v) przedstawiony na rysunku 52c jest znacznie bogatszy, aniżeli dla analogicznej próbki kwasu mlekowego rozpuszczonej w acetonitrylu (rys. 52a). Ta bogatsza struktura prawdopodobnie jest spowodowana większą zdolnością do tworzenia wiązań wodorowych kwasu mlekowego z 70% etanolem, niż w przypadku układu kwas mlekowy – acetonitryl. Niemniej jednak widma masowe odpowiadające najwyższym pikom na chromatogramie kwasu mlekowego świeżo rozpuszczonego w 70% etanolu są stosunkowo proste i podobne do siebie. Dominujący sygnał w trzech zarejestrowanych widmach masowych znajduje się przy $m/z = 306$ lub 319. Sygnał znajdujący się przy $m/z = 306$ prawdopodobnie odpowiada tetrametrowi kwasu mlekowego. Widmo masowe na rysunku 52d zarejestrowano po czasie 400 minut. Jest ono znacznie bogatsze w sygnały, niż próbka świeżo przygotowanego roztworu kwasu

mlekowego w 70% EtOH. Grupa sygnałów pojawia się wokół $m/z = 650$ lub 800 w postaci rozkładu normalnego. Zaprezentowane widmo masowe próbki po 400 minutach przechowywania dobitnie świadczy o kumulacji w niej produktów przemiany, którą najprawdopodobniej są oligomery kwasu mlekowego.

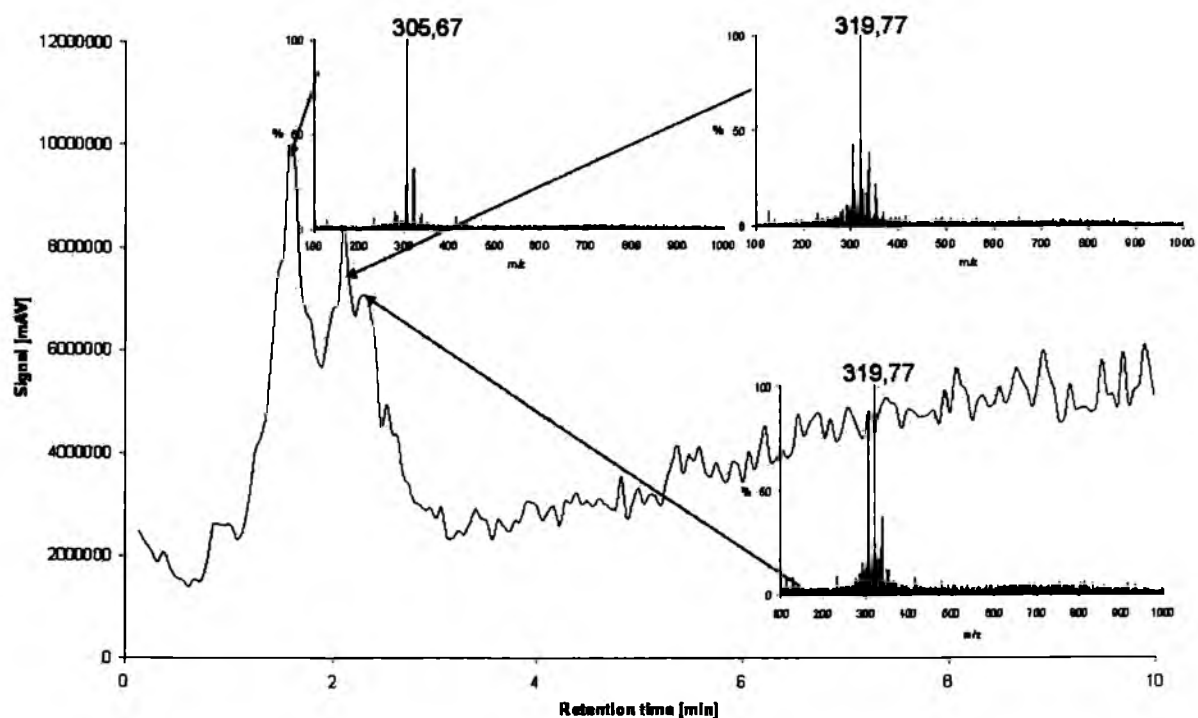


(a)

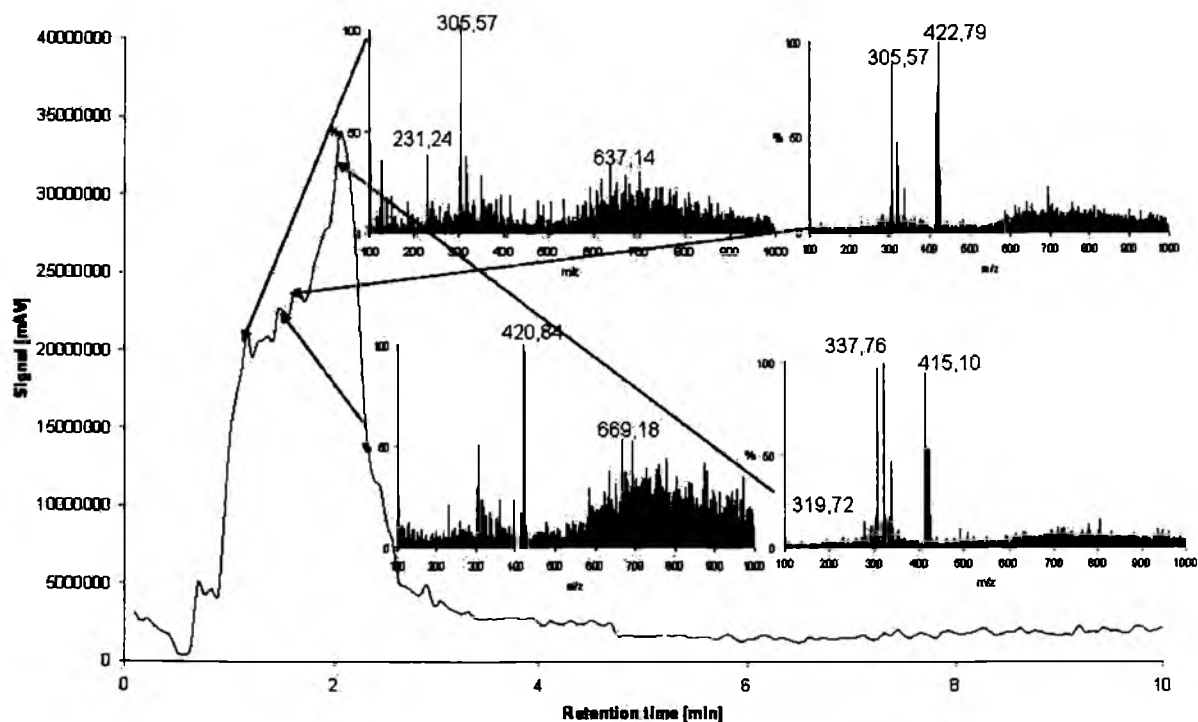


(b)

Rys. 52a-b. Chromatogramy kwasu *L*-mlekowego rozpuszczonego w acetonitrylu, zarejestrowane w układzie LC-MS po (a) 0 min i (b) 900 min przechowywania próbki w $T = 22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Na chromatogramach dodatkowo zamieszczono widma masowe zarejestrowane dla wskazanych pików.



(c)

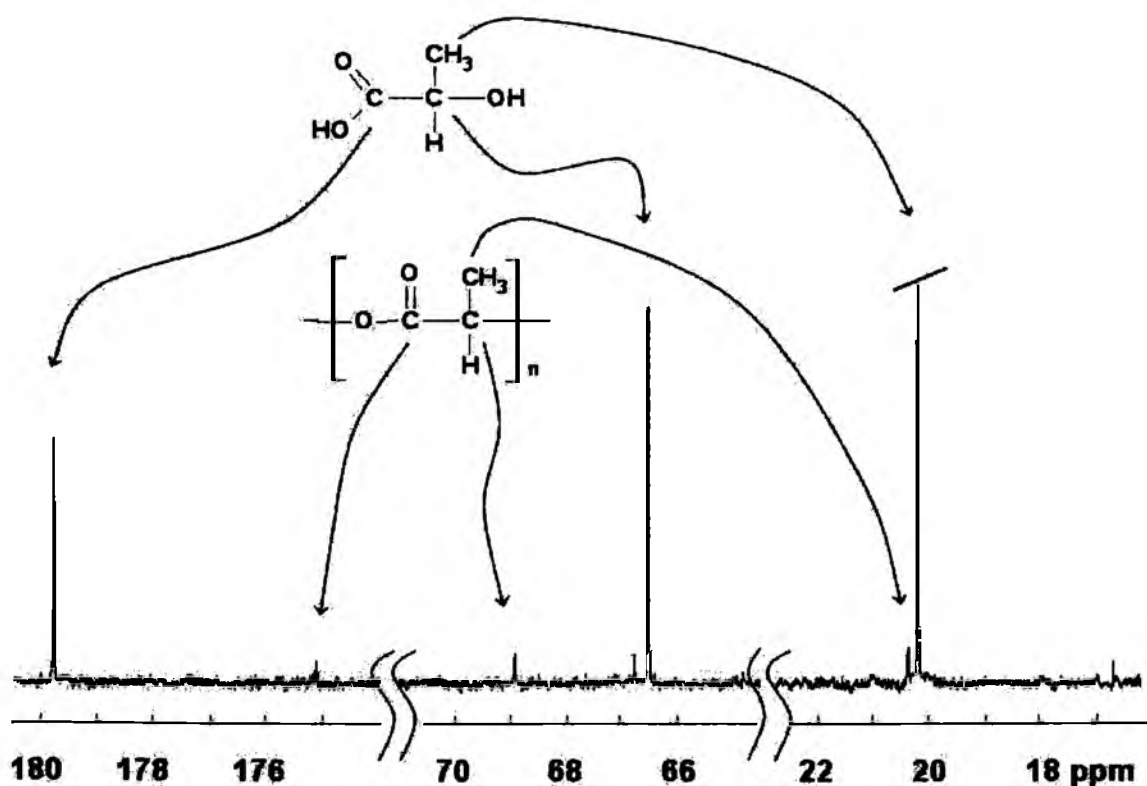


(d)

Rys. 52c-d. Chromatogramy kwasu *L*-mlekowego rozpuszczonego w 70% etanolu, zarejestrowane w układzie LC-MS po (c) 0 min i (d) 400 min przechowywania próbki w $T = 22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Na chromatogramach dodatkowo zamieszczono widma masowe zarejestrowane dla wskazanych pików.

7.4.2.3. Spektroskopia węglowego magnetycznego rezonansu jądrowego (^{13}C NMR)

W celu lepszego zobrazowania badanego procesu kondensacji kwasu mlekowego zastosowano jeszcze inną technikę analityczną, niż wysokosprawna chromatografia cieczowa. W tym celu etanolowy roztwór kwasu *L*-(+)-mlekowego przechowywanego przez okres 10-ciu dni w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ odparowano do sucha z etanolu i rozpuszczonego w deuterowanym chloroformie (CDCl_3). Tak przygotowaną próbkę poddano badaniu techniką spektroskopii ^{13}C NMR i zarejestrowano widmo ^{13}C NMR. Rysunek 53 przedstawia zakres aromatyczny widma ^{13}C NMR dla kwasu *L*-(+)-mlekowego przechowywanego w roztworze etanolowym.



Rys.53. Widmo ^{13}C NMR, zarejestrowane w temperaturze 25°C , dla kwasu *L*-(+)-mlekowego rozpuszczonego w zdeuterowanym chloroformie (CDCl_3), po 10 dniach przechowywania w roztworze etanolowym [149,150].

Główne piki o wartościach sygnałów 20.19, 66.54 i 179.77 ppm mogą być wyróżnikiem odpowiednio grup metylowych, asymetrycznego atomu węgla C-2 oraz atomu węgla pochodzącego z grupy karbonylowej monomerycznego kwasu mlekowego. W sąsiedztwie

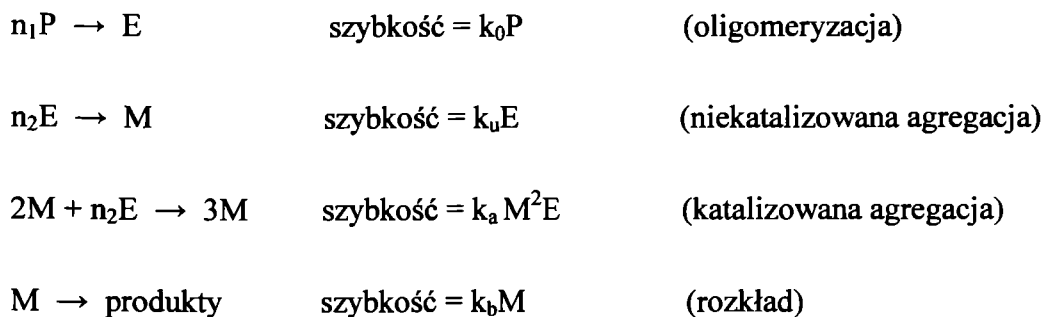
trzech głównych pików próbki przez 10 dni przechowywanej w roztworze etanolowym pojawiają się nowe piki o mniejszej intensywności, które można przypisać analogicznym atomom węgla w poszczególnych jednostkach skondensowanego polikwasu. Tak więc sygnał pochodzący od węgla grupy metylowej znajduje się przy 20.36 ppm, sygnał pochodzący od asymetrycznego atomu węgla obecny jest przy 68.94 ppm, a sygnał od grupy karbonylowej znajduje się przy 175.12 ppm.

Przesunięcia chemiczne dla alifatycznych atomów węgla znajdujących się na końcach oligomerycznego łańcucha polikwasu powinny znacząco różnić się od przesunięć chemicznych pochodzących od alifatycznych atomów węgla znajdujących się w środku tego łańcucha. Takich sygnałów nie obserwujemy jednak w przedstawionym widmie, co zdaje się wskazywać na wysoką liczbę skondensowanych jednostek monomerycznych, a więc i na tworzenie się względnie długiego łańcucha skondensowanego polikwasu.

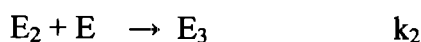
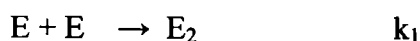
Badania przeprowadzone techniką spektroskopii ^{13}C NMR w pełni potwierdzają wyniki pochodzące z wysokosprawnej chromatografii cieczowej świadczące o tym, że kwas mlekowy ulega samorzutnej polikondensacji.

7.4.3. Modelowanie procesów oscylacyjnej inwersji chiralnej i oscylacyjnej kondensacji kwasu *L*-mlekowego

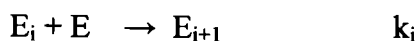
Na podstawie wyników doświadczalnych dotyczących kwasu *L*-mlekowego skonstruowano model procesu oscylacyjnej kondensacji. Model ten został opracowany przez prof. Irwinga R. Epsteina z Brandeis University w Waltham, Massachusetts (USA) przy ścisłej współpracy z naszym ośrodkiem, polegającej na zapewnieniu odpowiednich wyników doświadczalnych, na dyskusji i sugestiach dotyczących kinetyki proponowanych w modelu reakcji elementarnych. Model uwzględnia tylko trzy indywidua: prekursor P (np. kwas mlekowy), krótki oligomer E wywodzący się z prekursora oraz agregat (prawdopodobnie micella M), który powstaje z kilku molekuł E. Zakłada się, że M może tworzyć się na jeden z dwóch sposobów: niekatalizowany lub katalizowany, w których M służy jako szablon do powstania większej ilości M. Reakcje elementarne przebiegają w następujący sposób:



Bardziej dokładny model powinien zawierać szczegółowe sekwencje elementarnych kroków agregacji [151]:



...

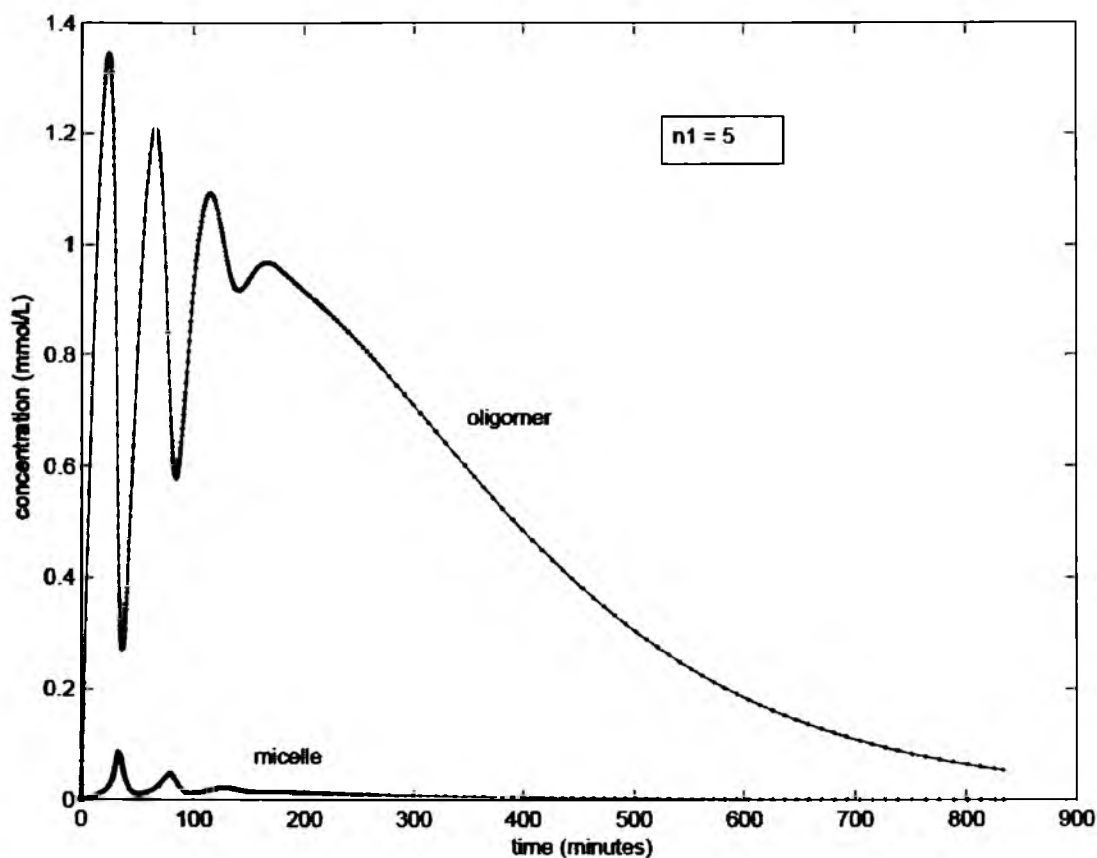


...

oraz analogiczne kroki elementarne przedstawiające powstawanie E z P.

Ponieważ nie posiadamy żadnej wiedzy na temat stałych szybkości poszczególnych reakcji agregacji, zastosowane zostało podejście analogiczne do zaproponowanego przez Coveney'a i Wattisa. Wszystkie elementarne kroki agregacyjne zostały w przyjętym przez nas modelu zastąpione przez pojedynczy krok agregacyjny o efektywnej liczbie agregacji (n_2) i efektywnej stałej szybkości agregacji (k_u) [152]. Podobne podejście zastosowano do opisu powstawania reaktywnych form E, gdzie n może być równe 1, jeżeli czynnik decydujący o szybkości enolizacji wystarczy do dalszego szybkiego sumowania cząsteczek, $n_1 = 2$, jeżeli, wymagana jest dimeryzacja itd. Jeżeli $n_1 > 2$, to wówczas równanie modelu zakłada możliwość wychwycenia sekwencji procesów inicjujących. Założony w niniejszej teorii model jest równocenny z modelem Gray-Scotta [153], przy czym rozpad prekursora związany ze zgrubnymi parametrami agregacji n_1 i n_2 prowadzi do oscylacji o wartościach n_1 wynoszących co najmniej 20 oraz do wartości n_2 mieszczących się w przedziale $1 \leq n_2 \leq 8$. Liczba oscylacji maleje wraz ze wzrostem n_1 i n_2 , czyli drgania są bardziej intensywne przy

mniejszych agregatach. Rysunek 54 przedstawia symulację dla $n_1 = 5$ i $n_2 = 8$. Amplituda (dla założonego stężenia 1.4 mmol/l) i złożonego okresu (około 30 min, co wynika z danych uzyskanych przy pomocy widm mocy) są zgodne z przeprowadzonym przez nas eksperymentem.



Rys.54. Symulacja oscylacji. Początkowe stężenie $P = 0.02$ mol/l. Wartości parametrów: $n_1 = 5$, $n_2 = 8$, $k_0 = 1.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; $k_u = 5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; $k_a = 2.5 \times 10^5 \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$, $k_b = 5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

7.5. Oscylacyjne zmiany wartości współczynnika retardacji (R_F) oraz skręcalności właściwej ($[\alpha]_D$) kwasu *S*- α -hydroksymasłowego i *R*- α -hydroksymasłowego

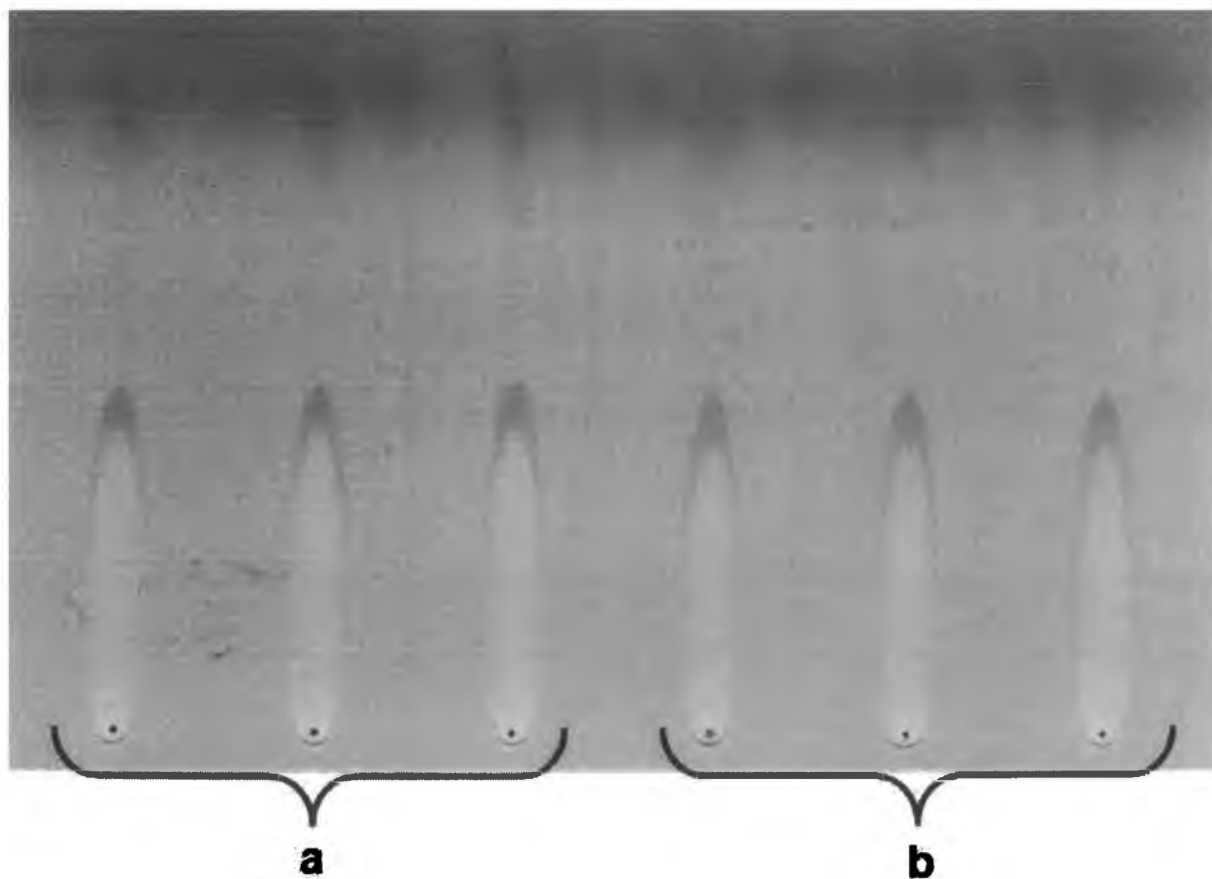
7.5.1. Chiralna chromatografia cienkowarstwowa

Celem niniejszych badań było eksperymentalne stwierdzenie, czy kwas *S*- α -hydroksymasłowy oraz kwas *R*- α -hydroksymasłowy ulegają konwersji chiralnej, czyli przemianie enancjomeru *R*-(+) w *S*-(-) i odwrotnie. Na podstawie przeprowadzonego przeglądu literaturowego i według naszej najlepszej wiedzy, wyniki prezentowane w tym rozdziale są pierwszą próbą separacji enancjomerów kwasu α -hydroksymasłowego przy pomocy chiralnej chromatografii cienkowarstwowej.

Mechanizm rozdziału enancjomerów kwasu α -hydroksymasłowego jest w pełni analogiczny do tego, jaki zastosowano w przypadku kwasu *L*-(+)-mlekowego i który przedstawiono rów. 15b.

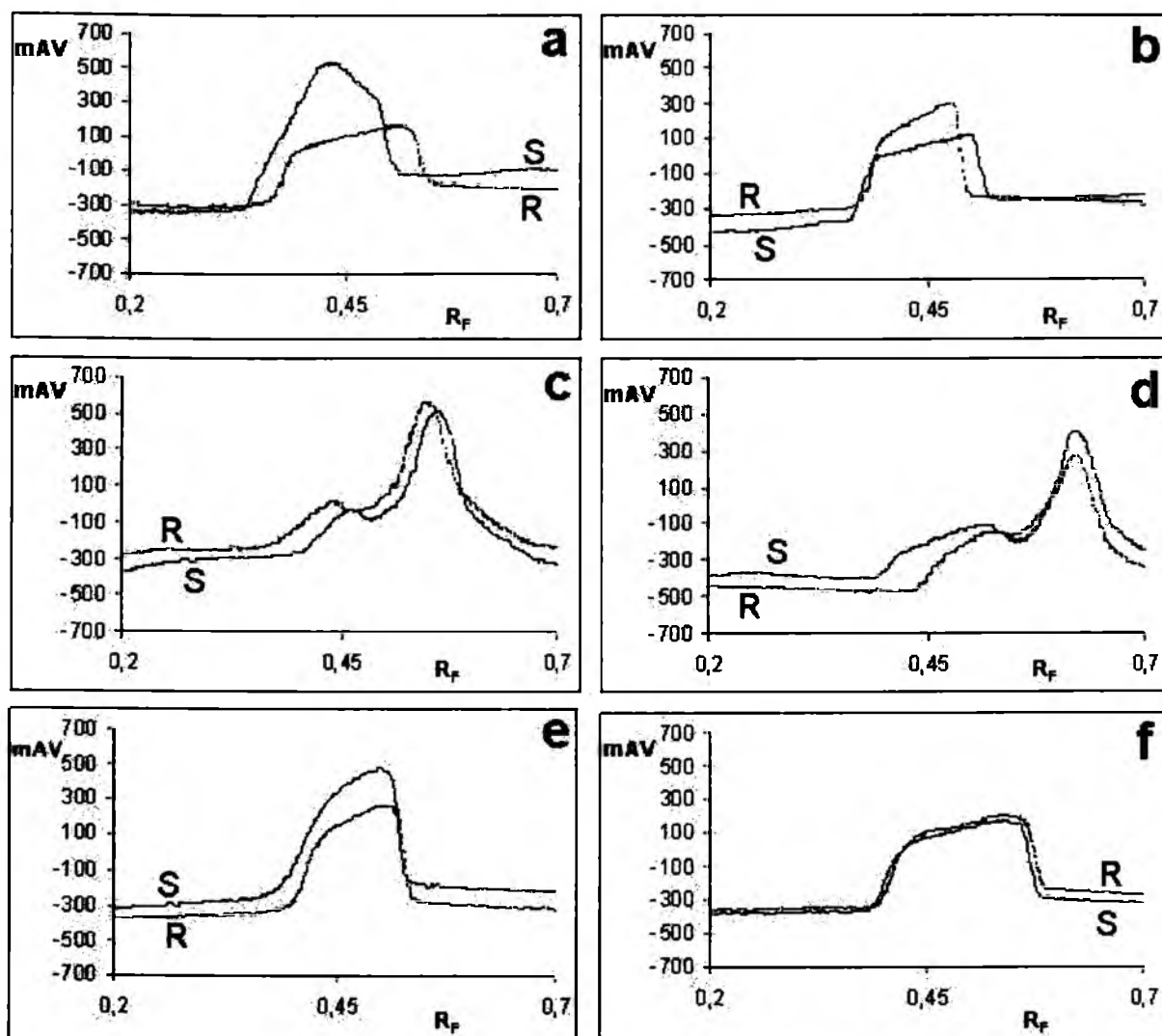
Rozdział chromatograficzny enancjomerów kwasu α -hydroksymasłowego prowadzono rozwijając chromatogramy jednokierunkowo i dwukierunkowo w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Do badania użyto próbek kwasu *S*- α -hydroksymasłowego i kwasu *R*- α -hydroksymasłowego, osobno rozpuszczonych w dwuskładnikowym rozpuszczalniku etanol-woda, w stosunku objętościowym 7:3. Tak przygotowane roztwory były następnie przechowywane w zamkniętych naczyniach przez okres 15 dni w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ i codziennie poddawane analizie chromatograficznej, celem wykrycia obecności antymerów badanych kwasów, a tym samym stwierdzenia, czy ulegają one procesowi chiralnej konwersji.

Na rys. 55 przedstawiono przykładowy wideoskan płytki chromatograficznej, na której jednokierunkowo rozwinięto próbki każdego z dwóch enancjomerów kwasu α -hydroksymasłowego po upływie siedmiu dni ich przechowywania.



Rys.55. Wideoskany chromatogramów otrzymanych po rozpuszczeniu (a) kwasu S- α -hydroksymasłowego w mieszaninie etanol-woda (7:3, v/v), (b) kwasu R- α -hydroksymasłowego w mieszaninie etanol-woda (7:3, v/v), przechowywanych przez okres 7 dni w temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$. Na wszystkie punkty startowe przedstawionych chromatogramów nanoszono jednakowe ilości (5 μl) poszczególnych roztworów o jednakowych stężeniu 50 g L^{-1} ($4.80 \times 10^{-1}\text{ mol l}^{-1}$)

Na chromatogramie uzyskanym przy rozwinięciu jednokierunkowym (rys. 55) widać brak różnicowania parametru retencyjnego R_F dla kwasu S- α -hydroksymasłowego i kwasu R- α -hydroksymasłowego. Nasunęło się więc pytanie, co było powodem obserwowanego braku tego różnicowania, czy nie trafny dobór warunków chromatograficznych, czy też w przypadku analizowanych kwasów proces konwersji chiralnej po prostu nie zachodził. Szukając odpowiedzi na to pytanie sporządzono sekwencję sześciu wykresów, przedstawiających profile stężeniowe, densytometrycznie uzyskane dla roztworów obu enancjomerów kwasu α -hydroksymasłowego po upływie 0, 2, 6, 9, 13 i 15 dni przechowywania odpowiednich próbek w temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$. Sekwencję tę przedstawiono na rys. 56.



Rys. 56. Sekwencja sześciu wykresów („stop-klatek”) przedstawiających nałożone na siebie profile stężeniowe dla roztworu kwasu *S*- α -hydroksymasłowego w układzie etanol - woda (7:3, v/v) oraz dla roztworu kwasu *R*- α -hydroksymasłowego w układzie etanol - woda (7:3, v/v), zdensytometrowanych po upływie (a) 0, (b) 2, (c) 6, (d) 9, (e) 13 i (f) 15 dni przechowywania odpowiednich próbek w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ [154]

Porównując profile stężeniowe enancjomerów *R* i *S* kwasu α -hydroksymasłowego widzimy, iż w miarę upływu czasu profile te coraz bardziej zbliżają się do siebie kształtem. Już na rys. 56c (czyli po upływie zaledwie 6 dni przechowywania roztworów) profile stężeniowe obu enancjomerów pokrywają się niemal całkowicie ze sobą, co jest najprawdopodobniej spowodowane szybko postępującą konwersją chiralną i praktycznym zrównaniem stężeń obu antymerów, czyli racemizacją obu rozpatrywanych próbek. Piętnastego dnia przechowywania próbek zarejestrowane profile stężeniowe pokrywają się już praktycznie całkowicie ze sobą. Ustawiczne zmiany kształtu obydwu profili stężeniowych

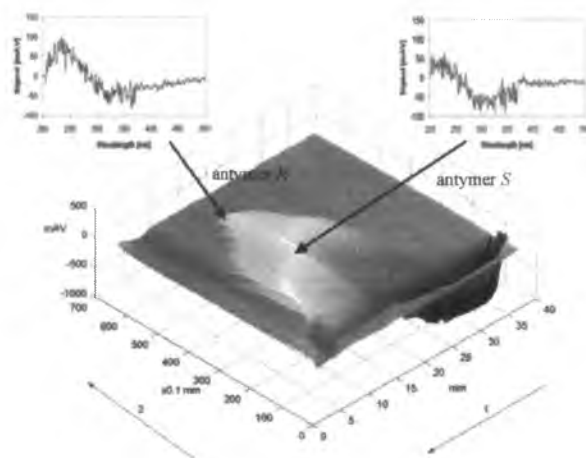
oraz zmiany pozycji maksimów tych profili na osi wartości R_F najprawdopodobniej są wynikiem nieustannego przebiegu oscylacyjnej konwersji chiralnej obu antymerów.

Zachęcona uzyskaniem częściowego rozdziału enancjomerów kwasu α -hydroksymasłowego techniką jednowymiarowej chromatografii cienkowarstwowej, postanowiłam spróbować jej dwuwymiarowego wariantu. W tym przypadku rozdział chromatograficzny był prowadzony dla roztworów czystych enancjomerów R i S kwasu α -hydroksymasłowego, przechowywanych przez okres 16 dni (oraz porównawczo dla laboratoryjnie sporządzonego roztworu racematu, przechowywanego przez okres 5 dni).

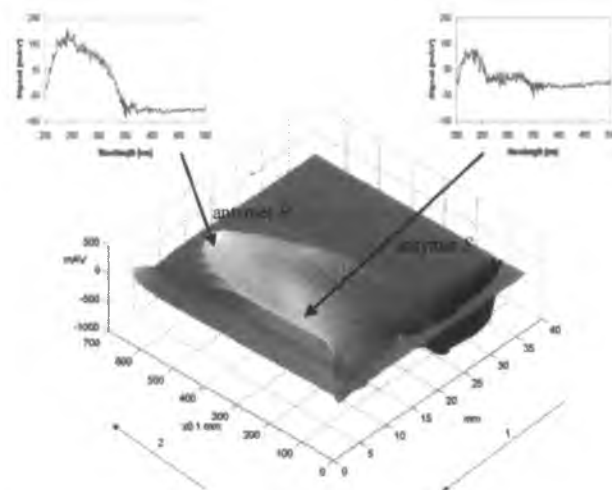
Na rys. 56 przedstawiono trójwymiarowe chromatogramy, obrazujące rozdział enancjomeryczny dla próbek kwasu S - α - i R - α -hydroksymasłowego oraz porównawczo dla mieszaniny racemicznej tego kwasu, rozpuszczonych w dwuskładnikowym rozpuszczalniku etanol-woda i przechowywanych przez odpowiedni okres czasu. Te trójwymiarowe chromatogramy posiadają pewną bardzo istotną zaletę, mianowicie widoczny jest na nich całkowity rozdział enancjomerów R i S dla czystych próbek enancjomerów kwasu α -hydroksymasłowego (rys. 57a,b), jak i dla kontrolnej próbki racematu tego kwasu (rys. 57c). Ten całkowity rozdział, prezentowany na rys. 57a,b, jeszcze dobitniej, aniżeli „stop-klatki” z rys. 56 zaświadcza o zachodzeniu konwersji chiralnej w przypadku kwasów R - i S - α -hydroksymasłowego

Dodatkowo *in situ*, czyli bezpośrednio na płytkach chromatograficznych, zarejestrowano widma UV rozdzielonych pasm antymerów kwasu α -hydroksymasłowego. Zróznicowanie intensywności absorpcji widoczne na odpowiednich widmach wyraźnie pokazuje, iż w każdym z trzech porównywanych przypadków (rys. 57a-c) enancjomeru R jest więcej, niż enancjomeru S . Prawdopodobnie wynika to z wolniejszego tempa konwersji chiralnej enancjomeru R , niż enancjomeru S .

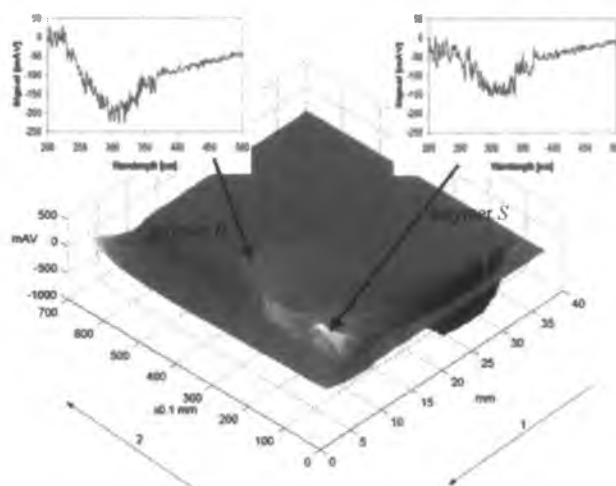
Niemniej, eksperyment chromatograficzny nie jest w stanie jednoznacznie rozstrzygnąć, czy racemizacja kwasu R - α -hydroksymasłowego i kwasu S - α -hydroksymasłowego dokonuje się natychmiast po rozpuszczeniu obu tych związków w zastosowanym rozpuszczalniku, czy też dopiero w układzie chromatograficznym. Prawdopodobnym wydaje się jednak, iż oddziaływania międzycząsteczkowe między chiralnym analitem i absorbentem mogą przyspieszać proces chiralnej konwersji, który zachodzi przede wszystkim poza układem chromatograficznym.



(a)



(b)



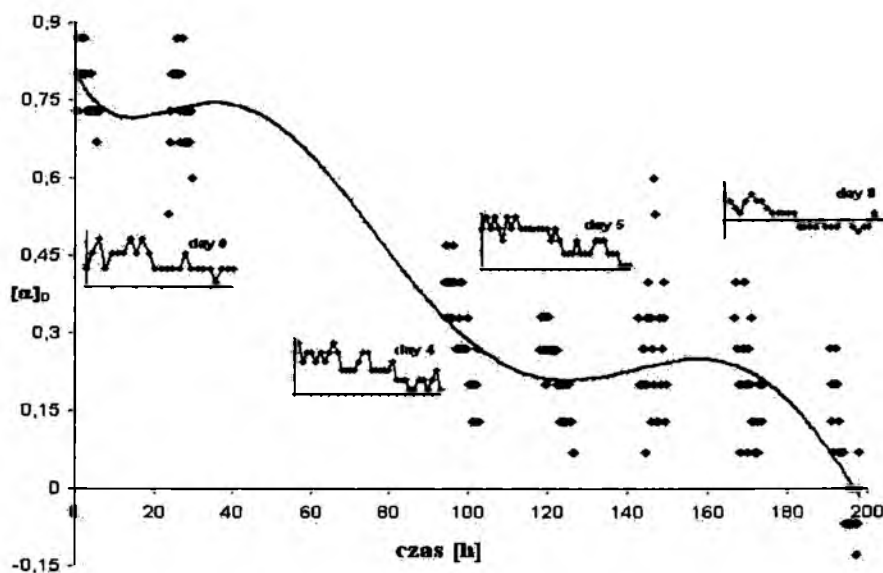
(c)

Rys. 57. Trójwymiarowe chromatogramy otrzymane techniką rozwijania dwukierunkowego dla a) roztworu kwasu *S*- α -hydroksymasłowego w układzie etanol - woda (7:3, v/v), przechowywanego przez okres 16 dni w temperaturze $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, b) roztworu kwasu *R*- α -hydroksymasłowego w układzie etanol - woda (7:3, v/v), przechowywanego przez okres 16 dni w temperaturze $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, oraz c) roztworu racemicznego kwasu *R,S*- α -hydroksymasłowego w układzie etanol - woda (7:3, v/v), przechowywanego przez okres 5 dni w temperaturze $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Chromatogramy skonstruowano ze skanów densytometrycznych, rejestrowanych wzdłuż drugiego kierunku rozwijania w odstępach 1 mm [154]

7.5.2. Polarymetria

7.5.2.1. Polarymetria kwasu *S*- α -hydroksymasłowego

Badanie zmian skręcalności właściwej kwasu *S*- α -hydroksymasłowego było przeprowadzone w trzech seriach doświadczeń. W pierwszym doświadczeniu zmiany skręcalności właściwej kwasu *S*- α -hydroksymasłowego w roztworze etanolowo-wodnym, przechowywanym przez 9 dni w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$, były rejestrowane w sposób nieciągły prawie codziennie, po kilka godzin dziennie w 15-minutowych odstępach czasu. Otrzymane wyniki przedstawiono na rys. 58.

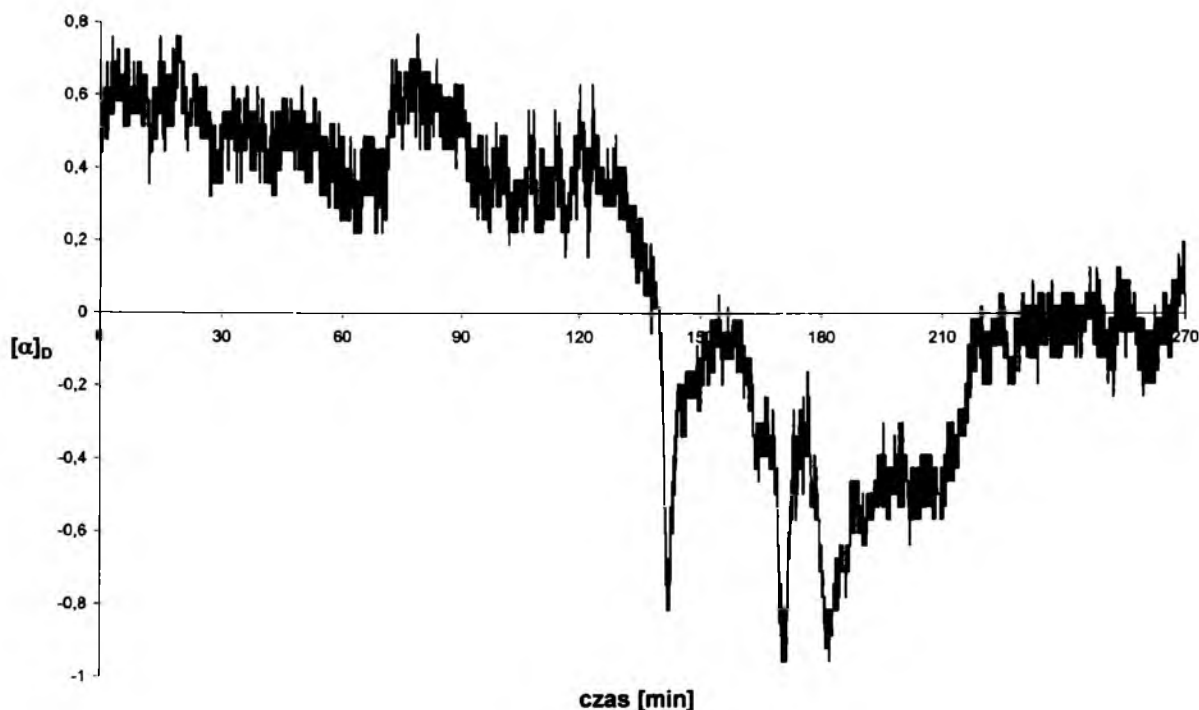


Rys. 58. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla kwasu *S*- α -hydroksymasłowego rozpuszczonego w rozpuszczalniku dwuskładnikowym etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3 w temperaturze $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Główny kierunek zmian jest zaznaczony linią ciągłą, a wykresy w „okienkach” obrazują zmiany zachodzące w wybranych dniach przeprowadzanego eksperymentu.

Rysunek 58 ilustruje następujące prawidłowości:

- ❖ Również w przypadku tego związku zmiany skręcalności właściwej były z natury oscylacyjne, co jest zwłaszcza doskonale widoczne w „okienkach” zamieszczonych na tym rysunku;
- ❖ długoterminowy trend zmian wartości skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ wskazuje na postępujący proces racemizacji kwasu *S*- α -hydroksymasłowego, gdyż wartości liczbowe $[\alpha]_D$ zmierzają do zera.

Do pełnej racemizacji kwasu *S*- α -hydroksymasłowego dochodzi po około 200 godzinach przechowywania roztworu. W drugim eksperymencie polarymetrycznym rejestrację oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej przeprowadzono w sposób ciągły, również w temperaturze 22°C, przez pierwsze 4,5 godziny od chwili sporządzenia roztworu kwasu *S*- α -hydroksymasłowego w rozpuszczalniku etanolowo-wodnym. Uzyskany wynik przedstawiono na rys. 59.

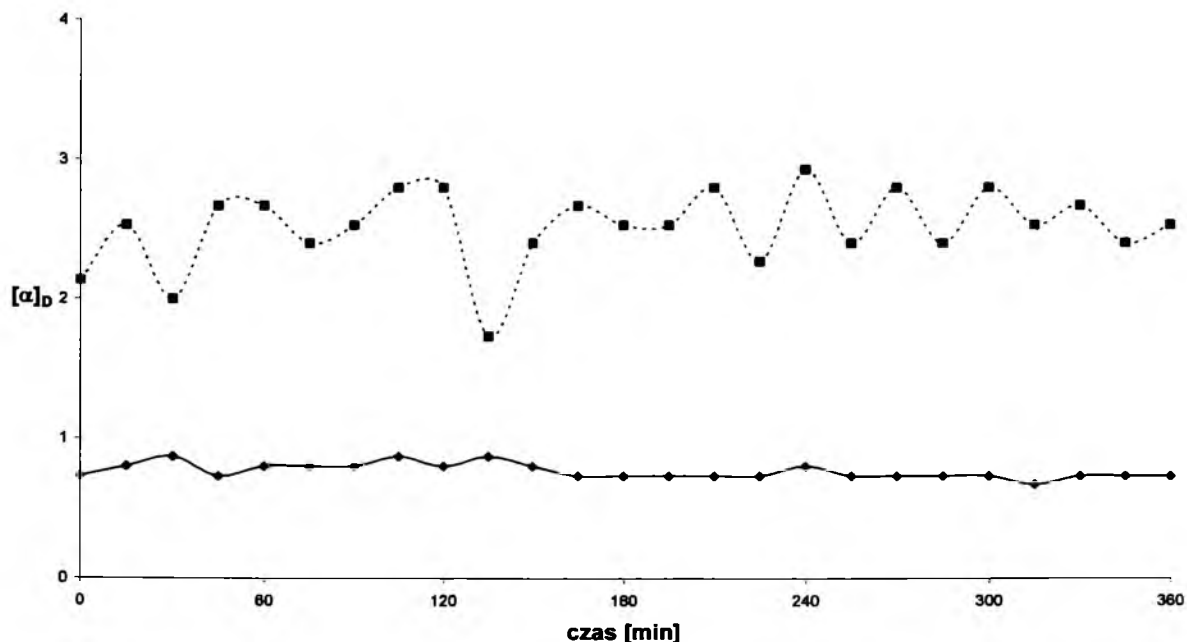


Rys.59. Ciągła rejestracja oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu w temperaturze 22±1°C dla roztworu kwasu *S*- α -hydroksymasłowego w rozpuszczalniku dwuskładnikowym etanol-woda, w stosunku objętościowym 7:3.

Wynik ciągłej rejestracji zmian skręcalności właściwej roztworu kwasu *S*- α -hydroksymasłowego w funkcji czasu jeszcze dobitniej przekonuje, iż zmiany te mają charakter oscylacyjny i dodatkowo potwierdza nasze przypuszczenie, iż obserwowane oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ są rezultatem oscylacyjnej konwersji chiralnej badanego kwasu.

W trzeciej serii doświadczeń skręcalność właściwa $[\alpha]_D$ roztworów kwasu *S*- α -hydroksymasłowego była mierzona w sposób nieciągły przez okres 6 godzin w dwóch temperaturach: 9±1°C i 22±1°C. W żadnym z tych dwóch przypadków skręcalność właściwa nie pozostawała niezmienna w czasie. Przeciwnie, obserwowano oscylacyjne zmiany

skręcalności właściwej w trakcie całego czasu trwania eksperymentu, amplituda tych zmian była jednak znacznie niższa w temperaturze $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, niż w temperaturze $9\pm 1^{\circ}\text{C}$. Na rys. 60 przedstawiono wyniki uzyskane w trzeciej serii doświadczeń.



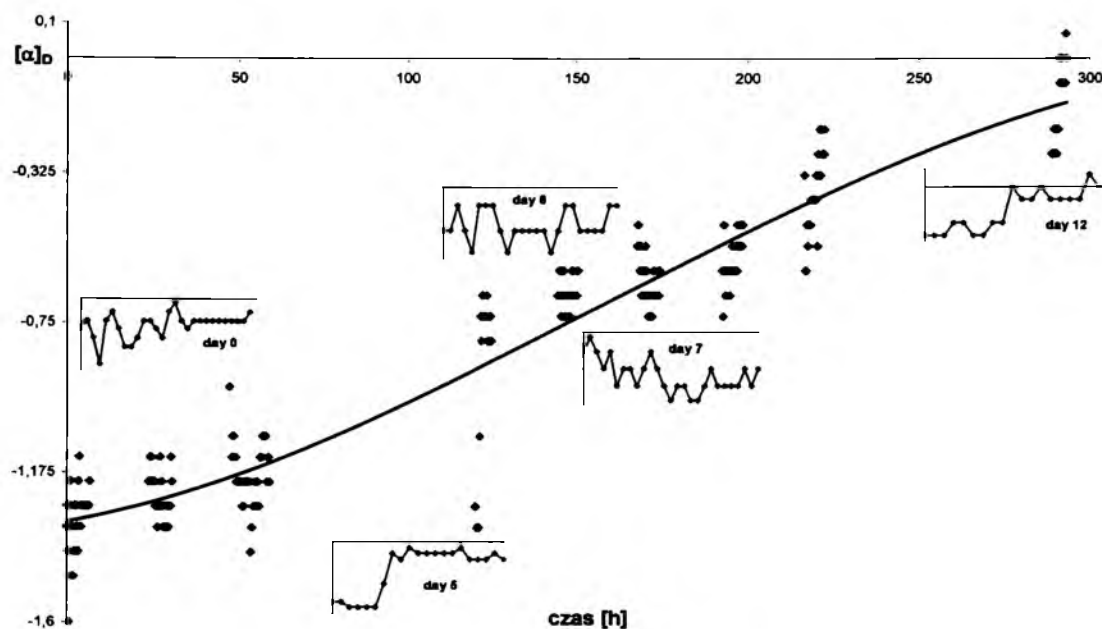
Rys.60. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla roztworu kwasu *S*- α -hydroksymasłowego rozpuszczonego w dwuskładnikowym rozpuszczalniku etanol-woda 7:3 (v/v), przechowywanego w temperaturze $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ (linia ciągła) oraz $9\pm 1^{\circ}\text{C}$ (linia przerywana)

Rejestracja zmian skręcalności właściwej w trzeciej serii prowadzonego eksperymentu polarymetrycznego miała na celu wyeksponowanie wpływu czynnika dyfuzyjnego na przebieg oscylacyjnej konwersji chiralnej kwasu *S*- α -hydroksymasłowego. Wpływ czynnika dyfuzyjnego starano się wyeksponować poprzez obniżenie temperatury badanego roztworu, co w sposób naturalny wiąże się ze wzrostem jego lepkości. Silny wzrost amplitudy oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ badanego roztworu, wywołany obniżeniem jego temperatury i jednocześnie wzrostem jego lepkości wskazuje na bardzo istotną rolę dyfuzji w badanym procesie, jak to ma bardzo często miejsce w przypadku różnych reakcji oscylacyjnych.

Wyniki badań polarymetrycznych oraz badań przeprowadzonych techniką chiralnej chromatografii cienkowarstwowej wyraźnie wskazują na to, iż kwas *S*- α -hydroksymasłowy może ulegać oscylacyjnej konwersji chiralnej, po uprzednim rozpuszczeniu w zawierającym wodę rozpuszczalniku niskocząsteczkowym.

7.5.2.2. Polarymetria kwasu *R*- α -hydroksymasłowego

Badania zmian skręcalności właściwej kwasu *R*- α -hydroksymasłowego, podobnie jak kwasu *S*- α -hydroksymasłowego, również były przeprowadzone w trzech seriach doświadczeń. W pierwszym doświadczeniu zmiany skręcalności właściwej roztworu kwasu *R*- α -hydroksymasłowego w roztworze etanolowo-wodnym, przechowywanym przez 13 dni w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$, były rejestrowane w sposób nieciągły prawie codziennie, po kilka godzin dziennie w 15-minutowych odstępach czasu. Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 61.



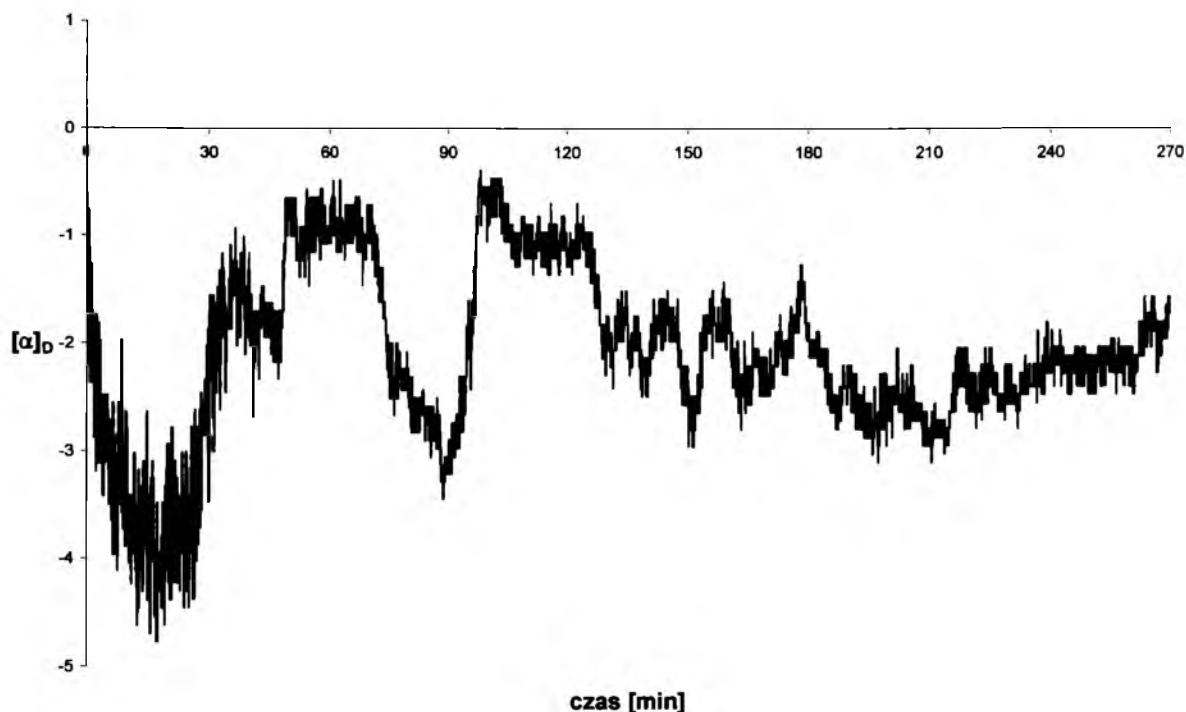
Rys. 61. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla kwasu *R*- α -hydroksymasłowego rozpuszczonego w rozpuszczalniku dwuskładnikowym etanol-woda w stosunku objętościowym 7:3 w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Główny kierunek zmian jest zaznaczony linią ciągłą, a wykresy w „okienkach” obrazują zmiany zachodzące w wybranych dniach przeprowadzanego eksperymentu.

W otrzymanych wynikach można zauważyć dwie prawidłowości:

- ❖ zmiany skręcalności właściwej były z natury oscylacyjne, co jest dobrze widoczne w „okienkach” zamieszczonych na rys.61;
- ❖ długoterminowy trend zmian wartości skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ wskazuje na postępujący proces racemizacji kwasu *R*- α -hydroksymasłowego (wartości $[\alpha]_D$ zmierzają do zera).

Do pełnej racemizacji kwasu *R*- α -hydroksymasłowego dochodzi po ponad 300 godzinach przechowywania roztworu.

W drugim eksperymencie polarymetrycznym rejestrację oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej przeprowadzono w sposób ciągły również w temperaturze 22°C przez pierwsze 4,5 godziny od chwili sporządzenia roztworu kwasu *R*- α -hydroksymasłowego w rozpuszczalniku etanolowo-wodnym. Uzyskany wynik przedstawiono na rys. 62.

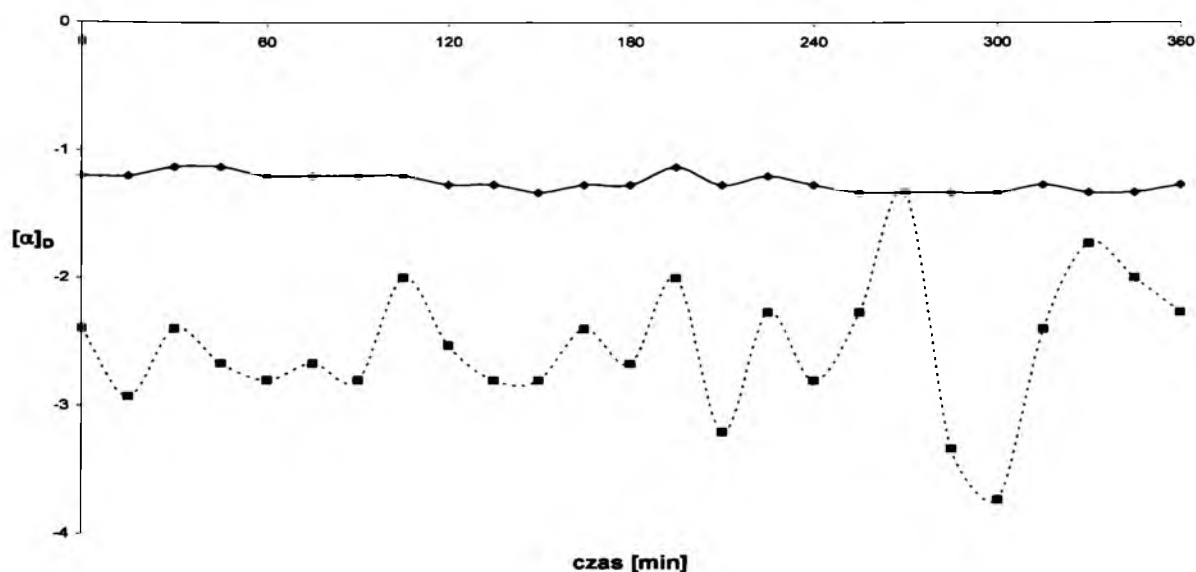


Rys. 62. Ciągła rejestracja oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ dla roztworu kwasu *R*- α -hydroksymasłowego w rozpuszczalniku dwuskładnikowym etanol-woda, w stosunku objętościowym 7:3

Wynik ciągłej rejestracji zmian skręcalności właściwej roztworu kwasu *R*- α -hydroksymasłowego w funkcji czasu dodatkowo potwierdza, iż zmiany te mają charakter oscylacyjny i jako rezultat oscylacyjnej konwersji chiralnej badanego kwasu są w pełni uzasadnione.

W trzeciej serii doświadczeń skręcalność właściwa $[\alpha]_D$ roztworów kwasu *R*- α -hydroksymasłowego była mierzona w sposób nieciągły przez okres 6 godzin w dwóch temperaturach: $9 \pm 1^\circ\text{C}$ i $22 \pm 1^\circ\text{C}$. W żadnym z tych dwóch przypadków skręcalność właściwa nie pozostawała niezmienna w czasie. Przeciwnie, obserwowano oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej w trakcie całego trwania eksperymentu, amplituda tych zmian była

jednakże znacznie niższa w temperaturze $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, niż w temperaturze $9\pm 1^{\circ}\text{C}$. Na rys. 63 przedstawiono wyniki uzyskane w trzeciej serii doświadczeń.



Rys. 63. Oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu dla roztworu kwasu *R*- α -hydroksymasłowego rozpuszczonego w dwuskładnikowym rozpuszczalniku etanol-woda 7:3 (v/v), przechowywanego w temperaturze $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ (linia ciągła) oraz $9\pm 1^{\circ}\text{C}$ (linia przerywana)

Rejestracja zmian skręcalności właściwej w trzeciej serii przeprowadzonego eksperymentu polarymetrycznego miała na celu wyeksponowanie wpływu czynnika dyfuzyjnego na przebieg obserwowanego procesu, najprawdopodobniej samorzutnej, oscylacyjnej konwersji chiralnej kwasu *R*- α -hydroksymasłowego. Wpływ czynnika dyfuzyjnego starano się wyeksponować poprzez obniżenie temperatury badanego roztworu, co wiąże się ze wzrostem jego lepkości. Silny wzrost amplitudy oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ badanego roztworu, wywołany obniżeniem jego temperatury i jednoczesnym wzrostem jego lepkości, wyraźnie widoczny na rys. 63, wskazuje na bardzo istotną rolę dyfuzji w badanym procesie, jak to ma bardzo często miejsce w przypadku różnych reakcji oscylacyjnych.

Tak więc wyniki badań przeprowadzonych techniką chiralnej chromatografii cienkowarstwowej oraz badań polarymetrycznych zdają się jednoznacznie wskazywać na to, iż kwas *R*- α -hydroksymasłowy może ulegać oscylacyjnej konwersji chiralnej, po uprzednim rozpuszczeniu w zawierającym wodę rozpuszczalniku niskocząsteczkowym.

Należy dodać, że proces ten wykazuje stosunkowo większą dynamikę w przypadku enancjomeru *S* niż enancjomeru *R*.

7.6. Oscylacyjne zmiany wartości współczynnika retardacji (R_F) oraz skręcalności właściwej ($[\alpha]_D$) kwasu R - β -hydroksymasłowego

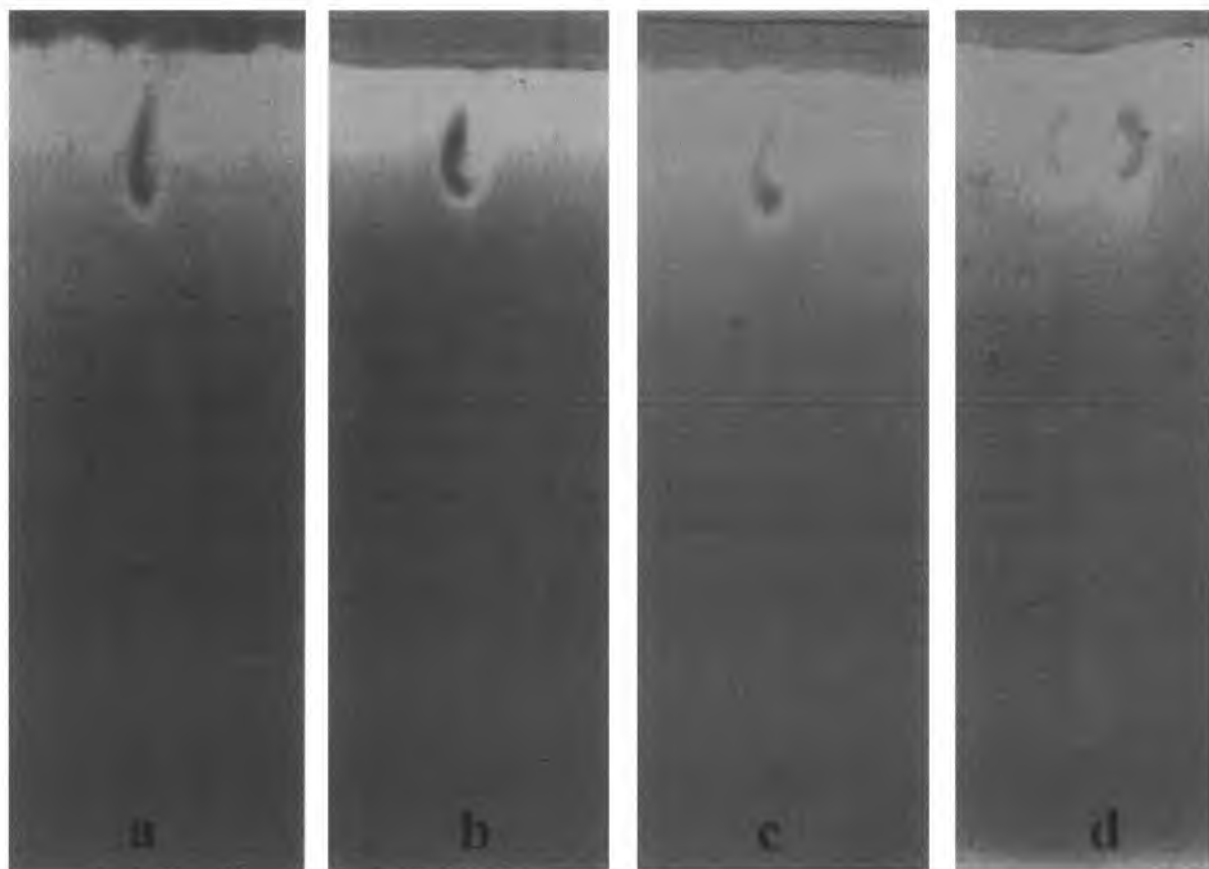
7.6.1. Chiralna chromatografia cienkowarstwowa

Celem niniejszych badań było eksperymentalne stwierdzenie, czy kwas R - β -hydroksymasłowy ulega konwersji chiralnej, czyli przemianie enancjomeru R -(+) w S -(-) i odwrotnie, a także próba rozdzielenia enancjomerów kwasu β -hydroksymasłowego. Na podstawie przeprowadzonego przeglądu literaturowego i według naszej najlepszej wiedzy, wyniki prezentowane w tym rozdziale są pierwszą próbą separacji enancjomerów kwasu β -hydroksymasłowego przy pomocy chiralnej chromatografii cienkowarstwowej.

Mechanizm rozdzielenia enancjomerów kwasu β -hydroksymasłowego jest w pełni analogiczny do tego, jaki zastosowano w przypadku kwasu L -(+)-mlekowego i który przedstawiono równ. 15b.

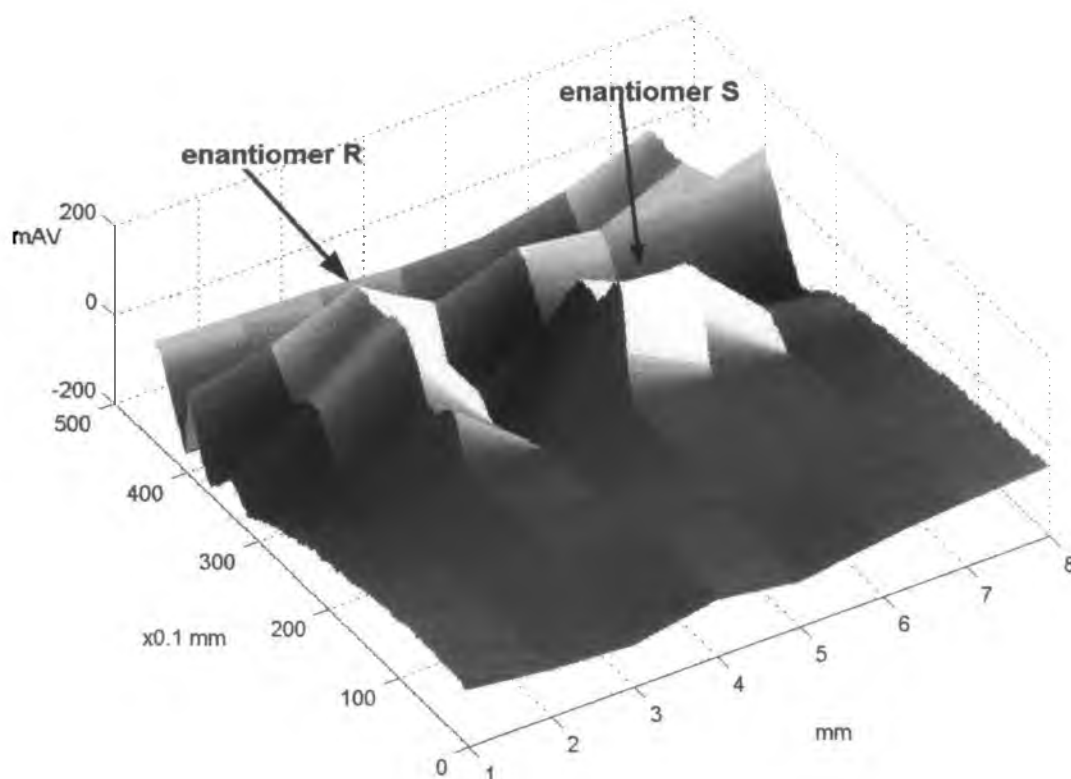
Do eksperymentu TLC przygotowano roztwór czystego optycznie enancjomeru kwasu R - β -hydroksymasłowego rozpuszczonego w dwuskładnikowym rozpuszczalniku etanol-woda, w stosunku objętościowym 7:3. Tak przygotowany roztwór był przechowywany w zamkniętym naczyniu w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$ przez cztery dni, a następnie poddawany analizie chromatograficznej w systemie jednokierunkowym. Płytki chromatograficzne, na które nanoszono roztwór kwasu R - β -hydroksymasłowego, były impregnowane metanolowo-wodnym roztworem octanu miedzi(II) $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$.

Rysunek 64 pokazuje nam cztery wideoskany chromatogramów otrzymanych po wywołaniu ich roztworem kwasu siarkowego(VI). Każdy chromatogram reprezentuje badaną próbkę w różnym czasie jej przechowywania. Na pierwszych trzech chromatogramach, otrzymanych dla roztworu kwasu R - β -hydroksymasłowego przechowywanego odpowiednio przez (a) 1, (b) 20 i (c) 47 godzin, widoczne są pojedyncze plamki chromatograficzne. Chromatogram czwarty pokazuje nam próbkę roztworu kwasu R - β -hydroksymasłowego przechowywanego przez okres 69 godzin. Obserwujemy na nim dwie plamki chromatograficzne „prawa” i „lewa”. A zatem na podstawie otrzymanych wyników możemy wydedukować, że okres 69 godzin przechowywania próbki jest czasem chiralnej konwersji enancjomeru R do mieszaniny ilościowo bliskiej racematowi, co umożliwiło dobrą wizualizację procesu enancjoseparacji.



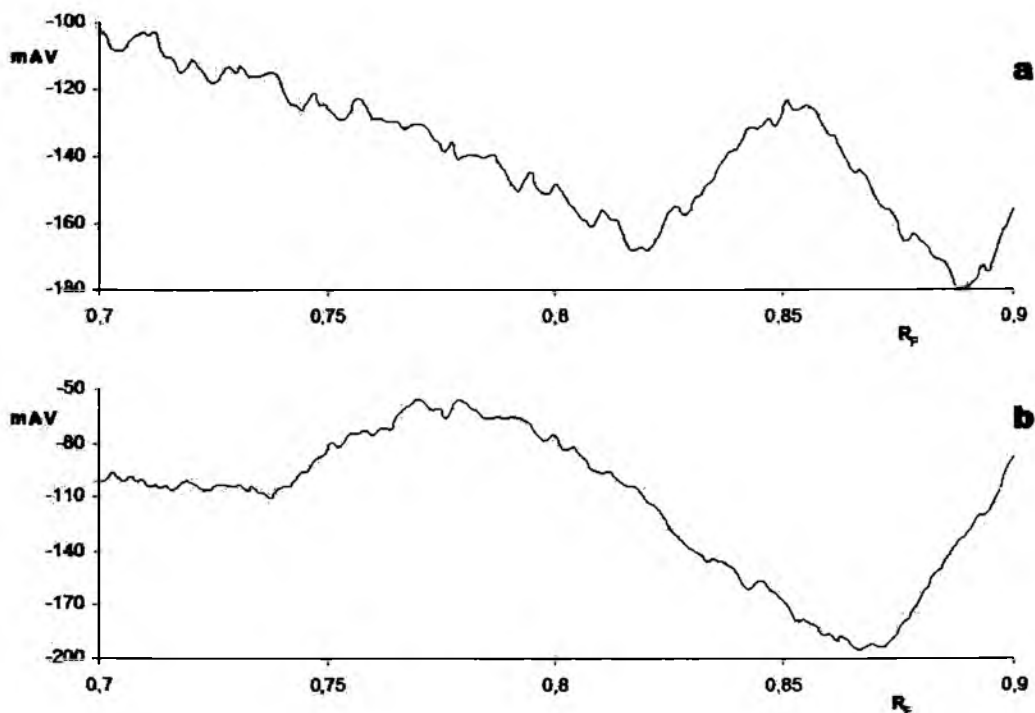
Rys.64. Wideoskany chromatogramów otrzymanych dla kwasu *R*- β -hydroksymasłowego rozpuszczonego w mieszaninie etanol-woda 7:3(v/v) i przechowywanych odpowiednio przez okres (a) 1, (b) 20, (c) 47 i (d) 69 godzin.

W celu lepszej wizualizacji tego procesu przedstawiono trójwymiarowy obraz profili stężeniowych antymerów kwasu β -hydroksymasłowego, który obrazuje nam rysunek 65. Ponadto z rysunku 64a-c możemy wywnioskować, iż „lewa” plamka to enancjomer *R*, a „prawa” plamka to enancjomer *S*.



Rys.65. Trójwymiarowy obraz chromatogramu kwasu β -hydroksymasłowego otrzymanego techniką rozwijania dwukierunkowego dla roztworu kwasu *R*- β -hydroksymasłowego w układzie etanol-woda 7:3 (v/v) i przechowywanego przez okres 69 godzin w temperaturze $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Chromatogram skonstruowano ze skanów densytometrycznych, rejestrowanych wzdłuż pierwszego kierunku rozwijania w odstępach 1mm

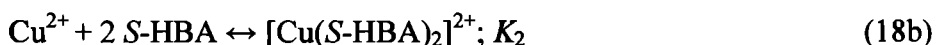
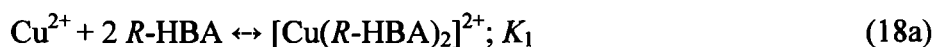
Rezultat rozdziłu zobrazowany rysunkami 64 i 65 dostarcza wystarczających dowodów na to, iż pomimo zastosowania jednokierunkowego systemu analizy chromatograficznej uzyskany rozdział jest dwuwymiarowy. Rozdział ten można uznać za horyzontalny, ale także za wertykalny, ponieważ maksima profili stężeniowych obu enancjomerów wskazują na różne wartości współczynnika retardacji R_F (Rys.66.). Dla enancjomeru *R* jest to wartość 0.86, natomiast dla jego antymeru jest to wartość 0.78, czyli sporo poza granicą błędu pomiaru, która wynosi ± 0.02 bezwymiarowej jednostki R_F .



Rys.66. Profile stężeniowe kwasu (a) R-β-hydroksymasłowego oraz (b) kwasu S-β-hydroksymasłowego po rozwinięciu dwukierunkowym płytki chromatograficznej.

Możemy powiedzieć, iż za rozdział horyzontalny odpowiada krystalicznie chiralna krzemionka. Na tej podstawie ośmielamy się twierdzić, że częściowy wertykalny rozdział w przypadku enancjomerów kwasu β-hydroksymasłowego spowodowany jest tworzeniem się z różną szybkością kompleksów między miedzią(II) a cząsteczkami kwasu.

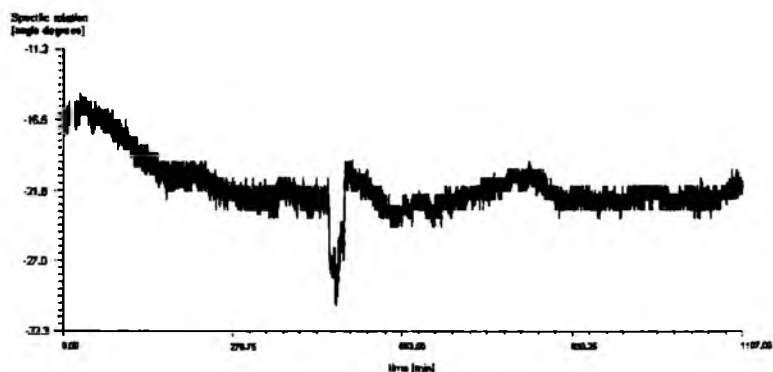
Prawdopodobny mechanizm rozdziału antymerów kwasu R i S-β-hydroksymasłowego (z powodu chiralnej konwersji drugi antymer jest samorzutnie wygenerowany spontanicznie w próbce) oparty jest na mechanizmie kompleksowania i schematycznie można go przedstawić poniższymi równaniami:



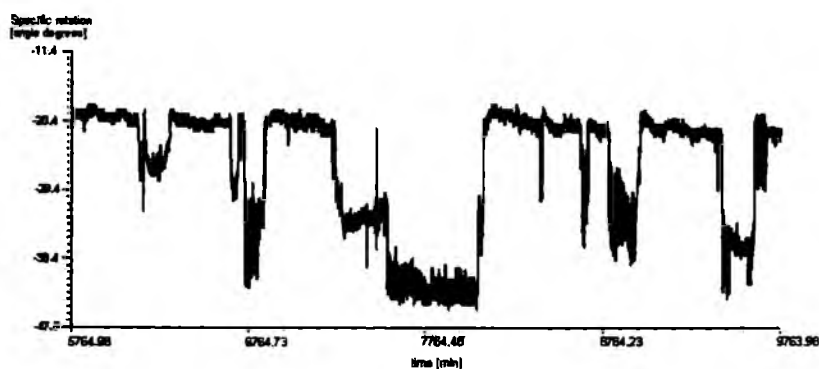
gdzie HBA to kwas β-hydroksymasłowy, K_1 i K_2 przedstawiają stałe równowagi odpowiednich reakcji chelatowania, natomiast nierówność $K_1 \neq K_2$ jest podstawowym warunkiem rozdziału chromatograficznego dwu antymerów kwasu migdałowego.

7.6.2. Polarymetria kwasu *R*- β -hydroksymasłowego.

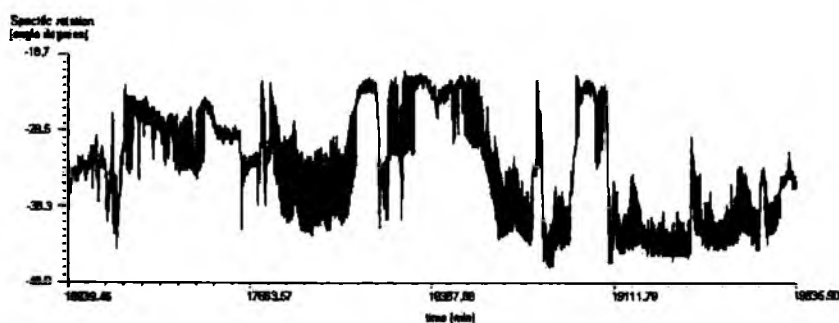
Badanie zmian skręcalności właściwej kwasu *R*- β -hydroksymasłowego w roztworze etanolowo-wodnym było przeprowadzone po raz pierwszy przy użyciu polarymetrii ciągłej. Pomiar były prowadzone przez okres 14 dni w temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$. Otrzymane wyniki przedstawiono na rys. 67.



(a)



(b)



(c)

Rys.67. Ciągła rejestracja oscylacyjnych zmian skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ w funkcji czasu w temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$ dla roztworu kwasu *R*- β -hydroksymasłowego w rozpuszczalniku dwuskładnikowym etanol-woda, w stosunku objętościowym 7:3 przechowywanych przez okres (a) od 0 do 19, (b) od 96 do 163, i (c) od 282 do 331 godzin w temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$

Wynik ciągłej rejestracji zmian skręcalności właściwej roztworu kwasu *R*- β -hydroksymasłowego w funkcji czasu ukazuje nam, iż zmiany te są znaczne, a ich amplituda wynosi ok. 20 jednostek. Wyniki przekonują nas, iż zmiany te mają charakter oscylacyjny i dodatkowo potwierdza nasze przypuszczenie, iż obserwowane oscylacyjne zmiany skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ są rezultatem oscylacyjnej konwersji chiralnej badanego kwasu. Obserwacje te doskonale współgrają z eksperymentem przeprowadzonym przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej. Rozdział w przypadku TLC nastąpił po kilkudziesięciu godzinach. W przypadku polarymetrii oscylacje wzmocniły się, a ich amplituda wzrosła w podobnym czasie. Fakt, iż oscylacje nastąpiły dopiero po pewnym czasie tłumaczy, dlaczego zaobserwowaliśmy rozdział dopiero w trzeciej dobie przechowywania próbki.

Tak więc wyniki badań przeprowadzonych techniką chiralnej chromatografii cienkowarstwowej oraz badań polarymetrycznych zdają się jednoznacznie wskazywać na to, iż kwas *R*- β -hydroksymasłowy może ulegać oscylacyjnej konwersji chiralnej, po uprzednim rozpuszczeniu w zawierającym wodę rozpuszczalniku niskocząsteczkowym.

8. Wnioski

Przedstawione w niniejszej rozprawie cele udało się zrealizować w całości. Jako zasadnicze osiągnięcia tej pracy należy wymienić:

- I. Chromatografia cienkowarstwowa, jako podstawowe narzędzie badawcze, wspomagana odpowiednimi pomiarami polarymetrycznymi, pozwoliła wykazać, iż wybrane związki, tj. siedem chiralnych kwasów karboksylowych, pochodnych kwasu propionowego i kwasu masłowego z grupy aminokwasów oraz hydroksykwasów po rozpuszczeniu w niskocząsteczkowych rozpuszczalnikach wodnych oraz niewodnych, ulegają samorzutnemu procesowi oscylacyjnej inwersji chiralnej, prawdopodobnie poprzez enol. Zaobserwowano, że zjawisko to zachodzi niezależnie od długości łańcucha badanego związku chiralnego, położenia (α lub β) centrum chiralności cząsteczki względem grupy karboksylowej oraz od klasy chemicznej, do której związek ten należy.
- II. W badaniach doświadczalnych zastosowano spektroskopię ^{13}C NMR, wysokosprawną chromatografię cieczową oraz spektrometrię mas, które wykazały, że inwersji chiralnej badanych związków towarzyszy ich polikondensacja. Oba te procesy są ze sobą sprzężone, zachodząc w sposób niemonotoniczny, a nawet oscylacyjny. Tak więc proces chiralnej inwersji można traktować jako równoległy do procesu polikondensacji.
- III. Wyniki otrzymane w trakcie prowadzonych badań wskazują na wielką przydatność techniki chromatografii cienkowarstwowej podczas prowadzenia określonych badań, zwłaszcza z zakresu chemii fizycznej.
- IV. Współpraca z prof. Irvingiem. R. Epsteinem (Brandeis University, Waltham, Massachusetts, USA) pozwoliła na opracowanie modelu procesu oscylacyjnej kondensacji kwasu mlekowego.

9. Streszczenie

Wcześniejsze badania nad zachowaniem chiralnych pochodnych kwasu propionowego (w tym m.in. dwóch arylowych pochodnych tego kwasu, tj. *S*-(+)-ibuprofenu i *S*-(+)-naproksenu), należących do grupy leków profenowych i rozpuszczonych w rozpuszczalnikach wodnych oraz w rozpuszczalniku niewodnym po raz pierwszy wykazały, iż związki te w warunkach abiotycznych mogą *in vitro* ulegać samorzutnej, oscylacyjnej konwersji chiralnej, w ten sposób przekształcając się we własne antymery. Badania te demonstrują istotną i wcześniej nie stwierdzoną labilność steryczną w warunkach pozaustrojowych wybranych, chiralnych pochodnych kwasu propionowego.

Wstępne wyniki dotyczące wykazanej labilności sterycznej kilku wybranych pochodnych kwasu propionowego z grupy profenów oraz oscylacyjnego charakteru obserwowanych konwersji skłoniły nas do refleksji w odniesieniu do prawdopodobnej powszechności tego zjawiska, zwłaszcza w kontekście oczywistego faktu, iż niskocząsteczkowe chiralne kwasy karboksylowe odgrywają istotną rolę w rozmaitych naturalnie przebiegających procesach biochemicznych.

Pytania odnośnie do sterycznej labilności chiralnych kwasów karboksylowych mogą być różnorakie i liczne. Miedzy innymi mogą one dotyczyć wpływu rodzaju podstawników przy centrum asymetrii, wpływu odległości między grupą karboksylową a tymże centrum, czy wreszcie wpływu długości szkieletu węglowego danego kwasu karboksylowego na występowanie bądź nie występowanie samorzutnej, oscylacyjnej konwersji chiralnej rozpatrywanych związków.

Niniejsza praca doktorska jest próbą znalezienia przynajmniej częściowej odpowiedzi na wyżej sformułowane pytania. W tym celu zaplanowano więc określone doświadczenia oraz dobrano odpowiednie do tych planów techniki analityczne. Stosując chromatografię cienkowarstwową i polarymetrię próbowano dowieść, iż zjawisko inwersji chiralnej dotyczy również innych, niż ibuprofen i naproksen, związków. Wytypowane związki do badań to wybrane hydroksykwasy o trzech i czterech atomach węgla w łańcuchu (pochodne kwasu propionowego i kwasu masłowego), a także o podstawniku hydroksylowym, znajdującym się przy atomach węgla α i β względem grupy karboksylowej. Ze względu energetycznych zdawało się, iż inwersja chiralna nie jest jedynym krokiem elementarnym.

W badaniach doświadczalnych zastosowano również spektroskopię ^{13}C NMR, wysokosprawną chromatografię cieczową oraz spektrometrię mas, które wykazały, że inwersji chiralnej badanych związków towarzyszy ich polikondensacja. Oba te procesy są ze

sobą sprzężone, zachodząc w sposób niemonotoniczny, a nawet oscylacyjny. Tak więc proces chiralnej inwersji można traktować jako równoległy do procesu polikondensacji. Wynikiem takiego przebiegu reakcji są kondensaty o różnej liczbie skondensowanych jednostek monomerycznych, a prawdopodobny mechanizm procesu chiralnej inwersji prowadzi przez produkt pośredni, którym jest enol.

Współpraca z prof. Irvingiem. R. Epsteinem (Brandeis University, Waltham, Massachusetts, USA) pozwoliła na opracowanie modelu procesu oscylacyjnej kondensacji kwasu mlekowego, który wykorzystano do symulacji procesów oscylacyjnej inwersji chiralnej i oscylacyjnej kondensacji.

10. Literatura:

- [1] N.C. Gillespie, „Charles Darwin and the Problem of Creation”, University of Chicago Press, Chicago, 1979
- [2] F. Darwin, „Life and Letters of Charles Darwin”, tom 3, John Murray, London, 1888
- [3] C. Darwin, „On the Origin of Species”, John Murray, London, 1859
- [4] D.H. Kenyon, G. Steinman, „Biochemical Predestination”, McGraw-Hill, New York, 1969
- [5] A.I. Oparin, „Proischozhdienije zyzni, Moskovskij Raboczij”, Moskwa, 1924 oraz „The Origin of Life”, Macmillan, New York, 1938
- [6] J.B.S. Haldane, Rationalists Annual, 148
- [7] A.I. Oparin, „The Origin of Life on the Earth” (trzecie wydanie), Academic Press, New York, 1957
- [8] S.W. Fox, K. Dose, „Molecular Evolution and the Origin of Life”, Marcel Dekker, New York, 1977
- [9] D.H. Kenyon, A. Nissenbaum, J. Mol. Evol., **7**, 245, 1976
- [10] S.L. Miller, Science, **117**, 528, 1953
- [11] www.racjonalista.pl
- [12] R.E. Dickerson, Sci. Am., **231**, 70, 1978
- [13] C.E. Folsome, „The Origin of Life: A Warm Little Pond”, Freeman, San Francisco, 1979
- [14] H. Clemmey, N. Badham, Geology, **10**, 141, 1982
- [15] J.B. Corliss, J.A. Baross, S.E. Hoffman, Oceanologica Acta, **SP**, 59, 1981
- [16] A. Nissenbaum, D.H. Kenyon, J. Oro, J. Mol. Evol., **6**, 253, 1975
- [17] H.R. Hullet, J. Theor. Biol., **24**, 56, 1969
- [18] D.E. Hull, Nature, **186**, 693, 1960
- [19] J. Sarfati, Tech. J., **12**, 263, 1998
- [20] P.H. Abelson, Science, **119**, 576, 1954
- [21] P.H. Abelson, Carnegie Institution of Washington Year Book, **54**, 107, 1955
- [22] N.W. Rutter, B. Blackwell, “Amino acid racemization dating”, pod redakcją N.W. Rottera i N.R. Catto, „Dating Methods for Quaternary Deposits”, Geological Association of Canada, 1995

-
- [23] J. Robins, M. Jones, E. Matisoo-Smith, „Amino Acid Racemization Dating In New Zeland: An Overview”, Auckland University, Private Bag 92019, Auckland, New Zeland, 2001
- [24] A.L Lehninger, „Principles of Biochemistry”, Worth Publishers, New York, 1982
- [25] C.K. Mathews, K.E. van Holde, Biochemistry (drugie wydanie), The Benjamin Cummings Publishing Company, San Francisco, 1996
- [26] E.J Ebbers, G.J.A. Ariaans, J.P.M. Houbiers, A. Bruggink, B. Zwanenburg, *Tetrahedron*, **53**, 9417, 1997
- [27] J.L Bada, R.A. Schroeder, *Die Naturwissenschaften*, **62**, 71, 1975
- [28] G.G Smith, R.C. Evans. „The efect of structure and conditions on the rate of racemization of free and bound amino acids”, pod redakcją P.E. Hare, T.C. Goeringa i J. Kinga, „Biogeochemistry of Amino Acids”, John Wiley, New York, 1980
- [29] J.L Bada, M.Y. „Shou Kinetics and mechanism of amino acid racemization in aqueous solution and in bones”, pod redakcją P.E. Hare, T.C. Goeringa i J. Kinga, „Biogeochemistry of Amino Acids”, John Wiley, New York, 1980
- [30] J.L. Bada, *Interdiscipl. Sci. Rev.*, **7**, 30, 1982
- [31] R Liardon, S. Jedermann, *J.Agr. Food Chem.*, **34**, 557, 1986
- [32] G.G. Smith, K.M. Williams, D.M. Wonnacott, *J. Org. Chem.*, **43**, 1, 1978
- [33] J.L Bada, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 137, 1972
- [34] M.J Pilling, P. W. Seakins, „Reaction Kinetics”, Oxford University Press, Oxford, 1995
- [35] R.A. Schroeder, J.L. Bada, *Earth-Sci. Rev.*, **12**, 347, 1976
- [36] S.M. Gaines, J.L. Bada, *J. Org. Chem.*, **53**, 2757, 1988
- [37] T.V. Brennan, S. Clarke, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **45**, 547, 1995
- [38] H. Elster, E. Gil-Av, S. Weiner, *J. Archaeol. Sci.*, **18**, 605, 1991
- [39] J.L. Bada, *Anthropologisch Anzeiger*, **45**, 1, 1987
- [40] G.H. Miller, P.B. Beaumont, A.J.T. Jull, B. Johnson, *Philos. T. R. Soc. B*, **337**, 149, 1992
- [41] J.L. Radkiewicz, H. Zipse, S. Clarke, K.N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 9148, 1996
- [42] A.C.T. van Duin, M.J. Collins, *J. Org. Chem.*, **29**, 1227, 1998
- [43] R. Liardon, S. Jedermann, *J.Agr. Food Chem.*, **34**, 557, 1986
- [44] M.J. Collins, D. Walton, A. King, *ACS Symp. Ser.*, **707**, 74, 1998

-
- [45] M.J. Collins, M.S. Riley, A.M. Child, G. Turner-Walker, *J. Archaeol. Sci.*, **22**, 175, 1995
- [46] J.L. Bada, *Earth Planet. Sci. Lett.*, **15**, 223, 1972
- [47] J.L. Bada, R. Protsch, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 1221, 1973
- [48] J.L. Bada, R.A. Schroeder, R. Protsch, R. Berger, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 914, 1974
- [49] A.S. Brooks, P.E. Hare, J.E. Kokis, G.H. Miller, R.D. Ernst, F. Wendorf, *Science*, **248**, 60, 1990
- [50] J.L. Bada, *Ann. Rev. Earth Pl. Sc.*, **13**, 241, 1985
- [51] J.L. Bada, *Science*, **248**, 539, 1990
- [52] M.J. Collins, E.R. Waite, A.C.T. van Duin, *Philos. T. R. Soc. B*, **354**, 51, 1999
- [53] E. Marshall, *Science*, **247**, 799, 1990
- [54] A.M. Pollard, C. Heron, „Archaeological Chemistry”, The Royal Society of Chemistry, London, 1996
- [55] J.L. Bada, R.A. Schroeder, G.F. Carter, *Science*, **184**, 791, 1974
- [56] J.L. Bada, P.M. Helfman, *World Archaeology*, **7**, 160, 1975
- [57] E. Gil-Av, B. Feibusch, R. Charles-Siegler, *Tetrahedron Lett.*, 1009, 1966
- [58] E. Gil-Av, B. Feibusch, *Tetrahedron Lett.*, 3345, 1967
- [59] E. Gil-Av, D. Nurok, w „Advances in Chromatography“, tom 10, pod redakcją G.C. Giddingsa R.A. Hellera, Marcel Dekker, New York, 1974
- [60] E. Gil-Av, *J. Mol. Evol.*, **6**, 131, 1975
- [61] S. Weiner, Z. Kustanovich, E. Gil-Av, W. Traub, *Nature*, **287**, 820, 1980[62] M. Sinibaldi, G.A. Goodfriend, G. Barkay, S. Marchese, E. Gil-Av, *Geoarcheology*, **14**, 441, 1999
- [63] J.D. Watson, F.H.C. Crick, *Nature*, **171**, 737, 1953
- [64] S.T. Miller, *Earth conditions Science*, **117**, 528, 1953
- [65] R. Stribling, S.L. Miller, *Orig. Life Evol. Biosph.*, **17**, 261, 1987
- [66] C. Chyba, C. Sagan, *Nature*, **355**, 125, 1992
- [67] R. Hayatsu, M.H. Studier, L.P. Moore, E. Anders, *Geochim. Cosmochim. Acta* **39**, 471, 1975
- [68] J.G. Lawless, C.E. Folsome, K.A. Kvenvolden, *Sci. Am.*, **226**, 38, 1972
- [69] P.G. Stoks, A.W. Schwartz, *Nature*, **282**, 709, 1979
- [70] P.G. Stoks, A.W. Schwartz, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **45**, 563, 1981

-
- [71] W. Van der Velden, , A.W. Schwartz, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **41**, 961, 1977
 - [72] C.E. Folsome, J. Lawless, M. Romiez, C. Ponnampereuma, *Nature*, **232**, 108, 1971.
 - [73] C.E. Folsome, J. Lawless, M. Romiez, C. Ponnampereuma, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **37**, 455, 1973
 - [74] W. Van der Velden, A.W. Schwartz, *Geochim. Cosmochim. Acta* **41**, 961, 1977
 - [75] K. Kvenvolden, J. Lawless, K. Perring, E. Peterson, J. Flores, C. Ponnampereuma, I.R. Kaplan, C. Moore, *Nature*, **228**, 923, 1970
 - [76] Z. Martins, O. Botta, M.L. Fogel, M.A. Sephton, D.P. Glavin, J.S. Watson, J.P. Dworkin, A.W. Schwarz, P. Ehrenfreund, *Earth Planet Sc Lett*, **270**, 130, 2008
 - [77] S. Epstein, R.V. Krishnamurthy, J.R. Cronin, S. Pizzarello, G.U. Yuen, *Nature* **326**, 477, 1987
 - [78] O. Botta, J.L. Bada, *Surv. Geophys.*, **23**, 411, 2002
 - [79] M.A. Sephton, *Nat. Prod. Rep.*, **19**, 292, 2002
 - [80] R. Stribling, S.L. Miller, *Orig. Life Evol. Biosph.*, **17**, 261, 1987
 - [81] B. Rasmussen, *Nature*, **405**, 676, 2000
 - [82] www.interpolska.pl
 - [83] A. Claude, Vilee, L.R. Berg, Eldra Pearl Solomon, D.W. Martin, "Biologia Villego", 2011
 - [84] K. Pytkowska „Nawilżanie i surowce nawilżające”
 - [85] B. A. Green, R. J. Yu, E. J. Van Scott, *Clinics in Dermatology*, **27**, 495-501, 2009
 - [86] RJ Yu, EJ Van Scott, *Textbook of cosmetic dermatology*, 77-93, 2005
 - [87] EJ Van Scott, RJ Yu, *Arch Dermatol*, **110**, 586-90, 1974
 - [88] EJ Van Scott, RJ Yu, *J Am Acad Dermatol*, **11**:867-79, 1984
 - [89] C.P. Clark, *Clinical Plastic Surgery*, **23**, 49-56, 1996
 - [90] M. Alam., J.S. Dover, Z.D. Draelos, „Kosmeceutyki”, 2006.
 - [91] <http://portalwiedzy.onet.pl>
 - [92] M. Papagianni, *Biotech. Adv.* **25**, 244-263, 2007
 - [93] M. Matthey, *Crit. Rev. Biotech.*, **12**, 87–132, (1992).
 - [94] C.R.Soccol1, L.P.S. Vandenberghe, C. Rodrigues, A. Pandey, *Food Technol. Biotechnol.*, **44**, 141–149, 2006
 - [95] S.Anastassiadis, H. Rhem, *Electron. J. Biotechnol.*, **8**, 147–161, 2005
 - [96] T.V. Finogenova., I.G. Morgunov, S.V. Kamzolova, O.G. Cheryavskaya, *Appl. Biochem. Micro-biol.*, **41**, 418–425, 2005.

-
- [97] M. Pazouki, T. Panda, *Bioprocess Engineering*, **19**, 435–439, 1998
- [98] H. Kautola, W. Rymowicz, Y. Linko, P. Linko, *Sciences Alimen.*, **12**, 383-392, 1992
- [99] J. Mansfeld, M. Forster, T. Hoffman., A. Schellenberger, , *Enzyme Microbiol. Technol.*, **17**, 11-17, 1995
- [100] M. Wojtatowicz, W. Rymowicz, M. Robak, J. M. Nicaud, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **6**, 49-54, 1997
- [101] J. Yigitoglu, *Islamic Acad. Sci.* **5**, 100-106, 1992
- [102] Cz. Jura, H. Krzanowska, *Encyclopedia biologiczna*, 2000
- [103] L.S. Moy, H. Murad, R.L. Moy, *J Dermatol Surg Oncol*, **19**, 243–246, 1993
- [104] E.J. Van Scott, R.J. Yu, *Cutis*, **93**, 222–228, 1989
- [105] H. Murad, A.T. Shamban, P.S. Pierro, *Dermatol Clin*, **13**, 285–307, 1995
- [106] www.wikipedia.pl
- [107] J. Drews, Springer Verlag, 43-46, 1999
- [108] W. Sneader, J. Wiley & sons, Chichester, 359-361, 2005
- [109] J. Beyond, *Epidemiology*, **11**, 371-374, 2000
- [110] <http://portalwiedzy.onet.pl>
- [111] J. Mc Murry, *Chemia organiczna*, 2003
- [112] Pasteur, L. *Compt. Rend.*, **51**, 298, 1860
- [113] C. R. Hale, *Nature*, **195**, 917–918, 1962
- [114] H. A. Stafford, *Am. J. Bot.*, **46**, 347–352, 1959
- [115] F. A. Loewus, H. A. Stafford, *Plant Physiol.*, **33**, 155–156, 1958
- [116] www.dietto.pl
- [117] J. Cohen, , I. Stewart, *The Collapse of Chaos*, 1994
- [118] M. Orlik, „Reakcje oscylacyjne porządek i chaos”, *WNT*, 1996
- [119] J. Faimon, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, **60**, 2901, 1996
- [120] K. Asaka, K. Oguro, *Electrochim. Acta*, **45**, 4517, 2000
- [121] A. Pechenkin, *Stud. Hist. Philos. M. P.* **33**, 269, 2002
- [122] P. Ruoff, *Physica D*, **84**, 204, 1995
- [123] S. Fujieda, Y. Mori, A. Nakazawa, Y. Mogami, *Adv. Space Res.*, **28**, 537, 2001
- [124] I. Hanazaki, Y. Mori, T. Sekiguchi, G. Rábai, *Physica D*, **84**, 228, 1995
- [125] W.C. Bray, A periodic reaction in homogeneous solution and its relation to catalysis, *J. Am. Chem. Soc.*, **43**, 1262-1267, 1921

-
- [126] Fotografie <http://www.chem.univ.gda.pl/~tomek/falereaktywnosci.htm>
- [127] B. Baranowski, *Nierównowagowa termodynamika w chemii fizycznej*, PWN, 1974
- [128] I. Prigogine, I. Stengert, „Z chaosu ku porządkowi”, PIW, 1990
- [129] I. Prigogine, „From Being to Becoming” Frejman, 1980
- [130] Stewart, L, Golubitsky, M., *Fearful Symmetry*. Penguin, 1992.
- [132] Virtual catalog of ScienceLab.com
- [133] R.E. Krik, D.F. Othmer *Encyclopedia of Chemical Technology, The Interscience Encyclopedia* 1952, **8**, 168,
- [134] <http://www.crossfirebeilstein.com>
- [135] P.A. Levene, H.L. Haller, *J. Biol. Chem.*, **69**, 165–173, 1926
- [136] G. Just, C. Luthe, and P. Potvin, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 2285–2288, 1982
- [137] E.A. Jares-Erijman, A.I. Ingrum, J.R. Carney, K.L. Rinehart, R. Sakai, *J. Org. Chem.*, **58**, 4805–4808, 1993
- [138] Macmillan, J. Simpson, *T.J.J. Chem.Soc. PerkinbTrans.*, **1**, 1487-1493, 1973
- [139] Seebach, D. Zueger, M. *Helv. Chim. Acta*, **65**, 495-503, 1982
- [140] R. Bhushan,; G.P. Reddy,; S. Joshi, *J. Planar Chromatogr. – Mod. TLC.*, **7**, 126-128, 1994
- [141] R. Bhushan, G.P. Reddy, and S. Joshi, *J. Planar Chromatogr.*, **7**, 126-128, 1994
- [142] M. Sajewicz, M. Gontarska, Ł. Wojtal, D. Kronenbach, M. Leda, I.R. Epstein, T. Kowalska, *J.Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 2008
- [143] M. Sajewicz, D. Kronenbach, D. Staszek, M. Wróbel, G. Grygierczyk, T. Kowalska, *J.Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 2008
- [144] R. Bhushan, G.P. Reddy, S. Joshi, *J. Planar Chromatogr.*, **7**, 126-128, 1994
- [145] R. Bhushan, G.P. Reddy, S. Joshi, *J. Planar Chromatogr. – Mod. TLC.*, **7**, 126-128, 1994
- [146] P. Belanger, J.G. Atkenson, R.S. Stuart, *Chem. Commun.*, 1067, 1969
- [147] L. Cecchi and P. Malaspina, *Anal. Biochem.*, **192**, 219-221, 1991
- [148] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **20**, 209 225, 2008
- [149] M. Sajewicz, M. Matlengiewicz, M. Leda, M. Gontarska, D. Kronenbach, T. Kowalska, I. R. Epstein, *J. Phys. Org. Chem.*, **23**, 1066, 2010

-
- [150] M. Sajewicz, M. Matlengiewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **21**, 259, 2009
- [151] R.Becker,; W. Döring, *Ann. Phys. (Leipzig)*, **24**, 719-752, 1935
- [152] Coveney, P.V; Wattis, J.A.D. *Molec. Phys.*, **104**, 177-185, 2006
- [153] J.H. Merkin,; D.J. Needham, S.K. Scott, *Proc. Roy. Soc. London A*, **406**, 299-323, 1986
- [154] M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, M. Wróbel, R. Pietka, T. Kowalska, J. *Planar Chromatogr. - Modern TLC*, **22**, 241-248, 2009

11. Życiorys

Imię i nazwisko: Dorota Kronenbach
Data i miejsce urodzenia: 14.08.1982, Jaworzno
Stan cywilny: panna
Adres zamieszkania: ul. Bernarda Wały 10b/59, 41-412 Mysłowice

Wykształcenie:

Od 2007: słuchaczka Studium Doktoranckiego przy Instytucie Fizyki
Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach
2002-2007 pięcioletnie, jednolite studia magisterskie; Uniwersytet
Śląski w Katowicach, Wydział Mat-Fiz-Chem., kierunek:
chemia. Specjalność: Fizykochemiczne metody w ocenie
środowiska
1997–2001 II Liceum Ogólnokształcące im. Emilii Plater w Sosnowcu

Doświadczenie zawodowe:

2007 Rozpoczęcie studiów doktoranckich stacjonarnych na
kierunku Chemia, Uniwersytet Śląski w Katowicach
2008-2011 Przyznanie stypendium doktoranckiego w ramach projektu
„Uniwersytet Partnerem Gospodarki Opartej na Wiedzy”
(UPGOW), współfinansowanego przez Unię Europejską
w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (EFS)
2008-2011 umowa o pracę z Uniwersytetem Śląskim na stanowisku
asystenta naukowo-dydaktycznego w Zakładzie Chemii
Ogólnej i Chromatografii Instytutu Chemii na Wydziale
Matematyki, Fizyki i Chemii

12. Lista prac własnych tematycznie związana z rozprawą doktorską

1. "TLC and polarimetric investigation of the oscillatory *in vitro* chiral inversion of *L*-alanine"
M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, T. Kowalska
Journal of Planar Chromatography - Modern TLC, 21, 43-47 (2008)
2. "Investigation of the spontaneous oscillatory *in vitro* chiral conversion of *L*-(+)-lactic acid"
M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, T. Kowalska
Acta Chromatographica, 20, 209-225 (2008)
3. "Experimental and model investigation of the oscillatory transesterification of *L*- α -phenylalanine"
M. Sajewicz, M. Gontarska, Ł. Wojtal, D. Kronenbach, M. Leda, I.R. Epstein, T. Kowalska
Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 31, 1986-2005 (2008)
4. "Experimental investigation of the oscillatory transesterification of *L*-tyrosine"
M. Sajewicz, D. Kronenbach, D. Staszek, M. Wróbel, G. Grygierczyk, T. Kowalska
Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 31, 2006-2018 (2008)
5. "TLC study of the separation of the enantiomers of lactic acid"
M. Sajewicz, E. John, D. Kronenbach, M. Gontarska, T. Kowalska
Acta Chromatographica, 20, 367-382 (2008)
6. "How to suppress the spontaneous oscillatory *in vitro* chiral conversion of α -substituted propionic acids? A thin-layer chromatographic, polarimetric, and circular dichroism study of complexation of the Cu(II) cation with *L*-lactic acid"
M. Sajewicz, E. John, D. Kronenbach, M. Gontarska, M. Wróbel, T. Kowalska
Acta Chromatographica, 21, 39-55 (2009)
7. "TLC in a search for structural limitations of spontaneous oscillatory *in vitro* chiral conversion. α -Hydroxybutyric and mandelic acids"
M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, M. Wróbel, R. Piętka, T. Kowalska
Journal of Planar Chromatography - Modern TLC, 22, 241-248 (2009)
8. "On the spontaneous condensation of selected hydroxy acids"
M. Sajewicz, M. Matlengiewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, T. Kowalska
Acta Chromatographica, 21, 259-271 (2009)

-
9. "TLC and polarimetric investigation of the oscillatory *in vitro* chiral conversion of *R-b*-hydroxybutyric acid"
M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, T. Kowalska
Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 33, 1047-1057 (2010)
 10. "Spontaneous oscillatory *in vitro* chiral conversion of simple carboxylic acids and its possible mechanism"
M. Sajewicz, M. Matlengiewicz, M. Leda, M. Gontarska, D. Kronenbach, T. Kowalska, I. R. Epstein
Journal of Physical Organic Chemistry, 23, 1066-1073 (2010)
 11. "Oligomerization oscillations of L-lactic acid in solutions"
M. Sajewicz, M. Dolnik, D. Kronenbach, M. Gontarska, T. Kowalska, I.R. Epstein
Journal of Physical Chemistry A, 115, 14331-14339 (2011)
 12. "Condensation oscillations of *L*-phenylglycine, *L*-phenylalanine, and *L*-phenylglycine – *L*-phenylalanine in solution"
M. Sajewicz, M. Dolnik, M. Gontarska, T. Kowalska, I. R. Epstein (w przygotowaniu)

13. Lista publikacji konferencyjnych tematycznie związanych z rozprawą doktorską

1. "Thin Layer Chromatographic and Polarimetric Investigation of the Spontaneous Oscillatory in vitro Transenantiomerization of *L*-Phenylalanine" (poster)
M. Sajewicz, M. Gontarska, Ł. Wojtal, I.R. Epstein, T. Kowalska
7th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Siófok (Węgry), 5-7.09.2007
2. "On an in vitro oscillatory chiral inversion of the selected *L*-amino acids and on its possible implications" (poster)
M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, D. Staszek, M. Wróbel, M. Leda, I.R. Epstein, T. Kowalska
1th International Conference on Drug Design & Discovery, Dubai (Zjednoczone Emiraty Arabskie), 4-7.02.2008
3. "New methods of separation of lactic acid enantiomers by means thin-layer chromatography." (poster)
M. Sajewicz, E. John, D. Kronenbach, M. Gontarska, T. Kowalska
II Sympozjum Naukowe nt. "Aktualne problemy chemii analitycznej", Katowice (Poland), 30.05.2008
4. "Investigation of the spontaneous oscillatory in vitro chiral inversion of *L*-(+)-lactic acid" (poster)
M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, T. Kowalska
19th International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis, Gdańsk (Polska), 8-12.06.2008
5. "On spontaneous oscillatory chiral conversion of different carboxylic acids in aqueous media" (poster)
M. Sajewicz, M. Leda, M. Matlengiewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, M. Wróbel, A. Sekuła, T. Kowalska, I.R. Epstein
XXXII Sympozjum Naukowe nt. "Chromatograficzne metody badania związków organicznych", Katowice-Szczyrk (Polska), 3-5.06.2009
6. "Experimental evidence of a spontaneous condensation of profens, amino acids and hydroxyl acids in aqueous ethanol" (poster)
M. Sajewicz, M. Matlengiewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, A. Noworzyn, A. Ostrowska, T. Kowalska
XXXII Sympozjum Naukowe nt. "Chromatograficzne metody badania związków organicznych", Katowice-Szczyrk (Polska), 3-5.06.2009
7. "On generality of spontaneous oscillatory chiral conversion in abiotic aqueous media with different carboxylic acids" (poster)
M. Sajewicz, M. Leda, M. Gontarska, D. Kronenbach, T. Kowalska, I.R. Epstein
12th European Symposium on Organic Reactivity, Haifa (Izrael), 6-11.09.2009
8. "Experimental evidence of a spontaneous condensation of amino acids and hydroxy acids in aqueous ethanol" (poster)
M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, T. Kowalska
12th European Symposium on Organic Reactivity, Haifa (Izrael), 6-11.09.2009
9. "Spontaneous peptide formation of α -amino acids and condensation of α -hydroxy acids in aqueous ethanol media" (wykład)
T. Kowalska, M. Leda, M. Sajewicz, R. Wrzałik, D. Kronenbach, M. Gontarska, I.R. Epstein
12th European Symposium on Organic Reactivity, Haifa (Izrael), 6-11.09.2009

-
10. "Experimental evidence of a spontaneous condensation of lactic acid dissolved in aqueous ethanol" (poster)
M. Sajewicz, M. Leda, D. Kronenbach, M. Gontarska, E. Berry, I.R. Epstein, T. Kowalska
5th Congress of Pharmacists of Serbia, Belgrad (Serbia), 13-17.10.2010
 11. "The HPLC study of aqueous and non-aqueous solutions of phenylalanine and phenylglycine" (poster)
M. Sajewicz, M. Gontarska, N. Kuśmierz, M. Możdżeń, A. Prudlik, T. Kowalska
XXXIV Sympozjum Naukowe nt. "Chromatograficzne metody badania związków organicznych", Katowice-Szczyrk (Polska), 8-10.06.2011
 12. "Study of condensation oscillations with *L*-lactic acid in pure acetonitrile and aqueous ethanol" (poster)
M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, T. Kowalska
XXXIV Sympozjum Naukowe nt. "Chromatograficzne metody badania związków organicznych", Katowice-Szczyrk (Polska), 8-10.06.2011
 13. "The HPLC study on spontaneous peptidization of phenylglycine, phenylalanine, and phenylglycine – phenylalanine systems" (poster)
M. Sajewicz, M. Gontarska, T. Kowalska
36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Budapeszt (Węgry), 19-23.06.2011
 14. "In vitro behaviour of mandelic acid and lactic acid solutions in aqueous media" (poster)
M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, T. Kowalska
40th Conference on Drug Synthesis and Analysis, Brno (Czechy), 12-14.09.2011

TLC and Polarimetric Investigation of the Oscillatory In-Vitro Chiral Inversion of L-Alanine

Mieczysław Sajewicz, Dorota Kronenbach, Monika Gontarska, and Teresa Kowalska*

Key Words

L-Alanine
TLC
Polarimetry
Oscillatory chiral inversion

Presented at the
7th Balaton Symposium,
September 5–7, 2007,
Siófok, Hungary

Summary

In recent TLC and polarimetric studies we showed, for the first time, the tendency of profen drugs to undergo spontaneous oscillatory chiral inversion in vitro. Because profen drugs are chiral propionic acid derivatives, we sought other chiral compounds with similar chemical structures and hence a similar tendency to spontaneously change their steric configuration. We have previously demonstrated that L- α -phenylalanine and L-tyrosine also undergo oscillatory in-vitro chiral inversion. We also demonstrated the effect of temperature and mixing on the process, and proposed a detailed model of the oscillator, providing the basis for mechanistic understanding of the oscillatory chiral inversion of these compounds. In this study we focused our attention on L-alanine, another amino acid with a chemical structure formally derived from propionic acid, and, again, by use of TLC and polarimetry, investigated the tendency of L-alanine to undergo oscillatory in-vitro chiral inversion when dissolved in neutral, acidic, and basic solvents. We also studied the effect of temperature and sample mixing. It was confirmed that L-alanine also undergoes chiral inversion. The dynamics of the process are specific to each compound.

1 Introduction

The oscillatory in-vitro chiral inversion of profen drugs (2-aryl-propionic acids used as nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAID) was first reported elsewhere [1–5]. For over three decades, however, the in-vivo chiral inversion of profens has been discussed in a vast number of reports. Most of these reports are based on experiments involving selected tissues, mostly the kidneys or livers of experimental animals (e.g. dogs, cats, rats, or mice). These tissues were homogenized and then used as cellular homogenates, subcellular fractions, and whole isolated cells; occasionally the whole organs were used. The chiral inversion of profen drugs was ascribed to the activity of enzymes present in the samples [6–9]. In 2004 a review article was published summarizing the abundant literature on the in-vivo chiral inver-

sion of profens and bearing the title “*Chiral Inversion of Drugs: A Coincidence or Principle?*” [10]. The results of our in-vitro experiments with profens [1–5]:

- confirm an assumption that chiral inversion of these compounds seems a principle rather than a coincidence; and
- make the proposed biochemical pathways of in-vivo chiral inversion debatable in view of the fact that biochemical scrutiny is ultimately performed in vitro.

The next step was to search for other chiral compounds with similar chemical structures and hence a tendency similar to that of profens to spontaneously change their steric configuration. We focused on the amino acids L- α -phenylalanine and L-tyrosine. Our experiments were performed on samples of these dissolved in low-molecular-weight solvents, basically ethanol–water mixtures. The results obtained are reported elsewhere [11, 12].

Chiral inversion of the amino acids is represented in simplified form as:



A detailed model of the oscillator was proposed [11], providing the basis of a mechanistic understanding of the oscillatory chiral inversion of the profens and amino acids.

The objective of this study was to investigate the tendency of L-alanine to undergo oscillatory in-vitro chiral inversion similar to that previously described for the profen drugs, and for L- α -phenylalanine and L-tyrosine. The investigations were performed using two independent techniques, thin-layer chromatography and polarimetry.

2 Experimental

2.1 L-Alanine

The chemical structure of L-alanine is given in **Figure 1**. Its isoelectric point, pI , is 6.02. In our study, we used L-alanine from Merck (Darmstadt, Germany; #1.01007). In both TLC and

M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, and T. Kowalska, Institute of Chemistry, Silesian University, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland.
E-mail: kowalska@urano.uto.us.edu.pl

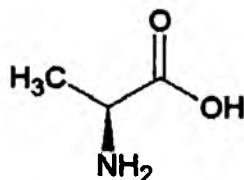


Figure 1

The chemical structure of L-alanine.

polarimetry we used solutions of L-alanine in ethanol–water 7:3 (v/v), ethanol–1 M hydrochloric acid 7:3 (v/v), and ethanol–1 M sodium hydroxide 7:3 (v/v); the concentration was always 5 mg mL⁻¹ (i.e. ca. 5.61×10^{-2} M). The L-alanine solutions were stored for nine days at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ to monitor the process of the oscillatory transesterification. After specific time intervals the solutions were analyzed by TLC and polarimetry.

2.2 Polarimetric Measurement of the Specific Rotation $[\alpha]_D$

L-Alanine solutions were stored at 9 ± 2 or $22 \pm 2^\circ\text{C}$ for 360 min, with and without mixing by ultrasonication of the measurement cell in a model RK 255H Sonorex Super (Bandelin, Berlin, Germany) ultrasonic bath, and the specific rotation $[\alpha]_D$ was measured at 15-min intervals with a Carl Zeiss (Jena, Germany) Polamat A polarimeter. The optical path length of the measurement cell was exactly 10 cm (= 1 dm) and the volume of solution was ca 1 mL. Specific rotation $[\alpha]_D$ was calculated using the equation:

$$[\alpha]_D = 100\alpha/cd \quad (2)$$

where α is the measured rotation (in angle degrees), D is the wavelength used (589 nm, which corresponds to the sodium D line), c is the concentration of the compound in g (100 mL)⁻¹ solution, and d is the measured sample thickness in dm.

From the literature [13] it is known that $[\alpha]_D$ for L-alanine at 20°C is ca $+13.5^\circ$ to $+15.5^\circ$ (apparently depending on the solvent used).

2.3 Commercial Silica Gel TLC Plates and their Pretreatment

TLC was performed on commercial 20 cm \times 20 cm glass plates precoated with 0.25 mm layers of silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Germany; #1.05715). Before use the plates were carefully washed by predevelopment with methanol–water 9:1 (v/v) and then dried at ambient temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) for 3 h.

The washed and dried plates were then impregnated twice by conventional dipping, lasting 2 s each. The first solution used for impregnation was 2.39×10^{-2} M aqueous CuSO₄ (analytical grade; POCh, Gliwice, Poland). After this first impregnation the plates were dried for 10 min at 105 – 110°C in a thermostatted chamber. The second solution used for impregnation was 3.04×10^{-2} L-proline (L-Pro; Merck #1.07434.0010) in water–methanol 9:1 (v/v). It should be noted that the molar ratio of Cu²⁺ cations to L-Pro molecules deposited on the plates was 1:2, to form the [Cu(L-Pro)₂]²⁺ complex in situ. After the second impregnation, the plates were dried again, at ambient temperature, for 3 h. The impregnated adsorbent layers were then ready for chromatography.

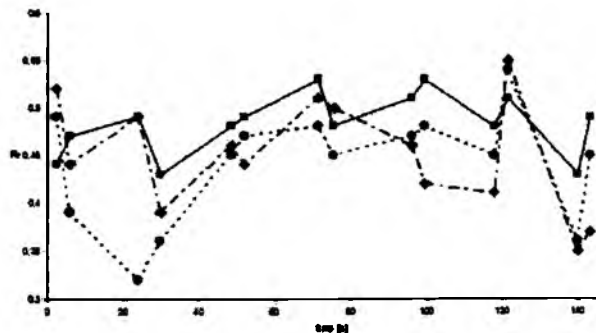
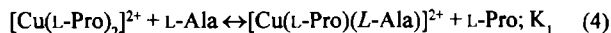


Figure 2

Dependence of the R_F of L-alanine dissolved in ethanol–water, 7:3 (v/v) (◆), ethanol–1 M hydrochloric acid, 7:3 (v/v) (■), and ethanol–1 M sodium hydroxide, 7:3 (v/v) (●), on sample storage time ($R_F = f(t)$) at $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.4 Mobile Phase and Development of Thin-Layer Chromatograms

Development of the L-alanine samples was performed at $22 \pm 2^\circ\text{C}$, to a distance of 10 cm, with 2-propanol–acetonitrile (ACN)–water 6:2:3 (v/v) as ternary mobile phase. The expected mechanism of retention for each of the two alanine (Ala) antipodes L-Ala and D-Ala is:



where $K_1 \neq K_2$. This mechanism of enantioseparation is known as ligand-exchange chromatography (or complexation chromatography). The TLC procedure used in this study was that reported by Bhushan et al. [14] for laboratory prepared plates, adapted for use with commercial precoated plates. Our second modification was replacement of *n*-butanol in the original ternary mobile phase with 2-propanol, although preserving the original volume proportions of the three solvents. This modification was made to slightly increase the R_F of alanine, which was low when *n*-butanol was used.

The alanine solutions were applied to the plates 1.5 cm above the lower edge, 5 μL spot⁻¹, by use of the Desaga (Heidelberg, Germany) AS 30 sample applicator. Nine samples at equal distances of 2 cm from each other were applied to each plate and the chromatogram was then developed in one-dimensional ascending mode. After development, the plates were dried at ambient temperature for 3 h, dipped for at least 2 s in freshly prepared 0.2% (w/v) ninhydrin solution in methanol, and heated at 100 – 110°C for ca. 10 min, to reveal the characteristic purple spots of the amino acid on a yellow background.

2.5 Densitometric Assessment of the Thin Layer Chromatograms

After visualization with ninhydrin each track on the chromatogram was densitometrically scanned at 1-mm intervals, with a width of 1 cm, in the direction of development. Each experiment was performed on two plates, so each result given in this paper is the mean from 18 individual development lanes.

Densitograms were acquired with a Desaga model CD 60 densitometer equipped with Windows-compatible ProQuant soft-

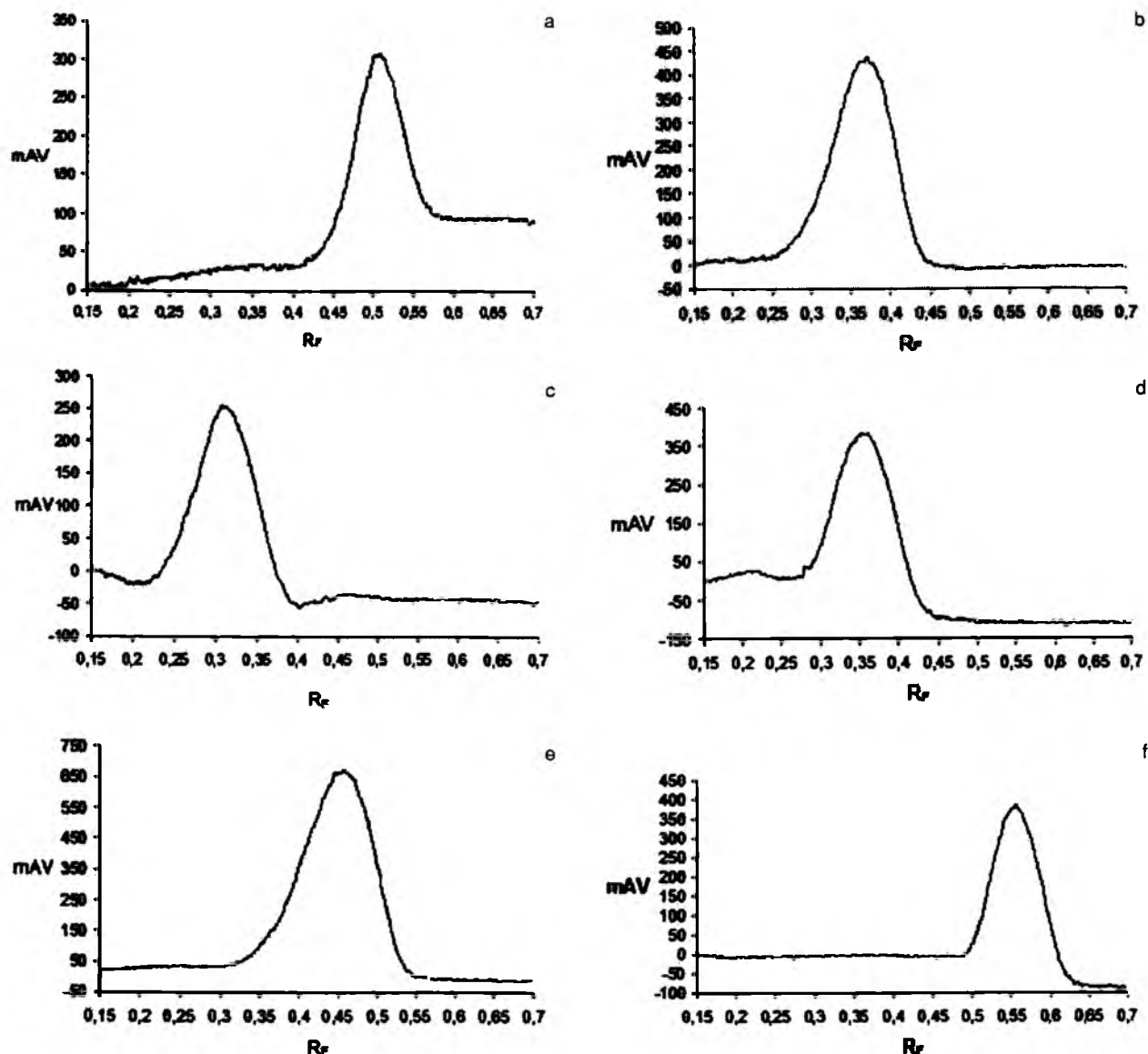


Figure 3

Sequence of densitometric concentration profiles for the solution of L-alanine in ethanol-1 M sodium hydroxide, 7:3 (v/v), after storage at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ for (a) 2.5 h, (b) 6.0 h, (c) 24.3 h, (d) 30.0 h, (e) 96.0 h, and (f) 171.5 h.

ware. Concentration profiles of the development lanes for alanine were recorded in visible light from the deuterium lamp (in reflectance mode) at 540 nm. The dimensions of the rectangular light beam were 2.0 mm \times 0.1 mm. The maxima of the concentration profiles were used for calculation of R_F values.

3 Results and Discussion

It is obvious that results from TLC cannot be directly compared with those from polarimetry, for at least two reasons. First, the TLC studies were performed for nine days and the polarimetric measurements for six hours, hence the storage times in TLC and polarimetry (i.e. the time scale of the experiments) were very different. Second, in the chromatographic experiment, the

amino acid sample was placed at the solid-liquid interface, with the adsorbent surface possibly able to act as a catalyst of chiral inversion whereas in the polarimetric measurements the amino acid molecules were present in the bulk phase.

Because investigation of the ability of L-alanine to undergo oscillatory in-vitro chiral inversion is our ultimate goal and the kinetics of this process on the solid-liquid interface compared with those in the bulk phase is of the secondary importance only, let us first consider the results originating from these two experiments separately and then reflect on the general conclusions.

3.1 Thin-Layer Chromatography

The objective of the experiment was to gather evidence on the oscillatory nature of the chiral inversion of alanine, i.e. to

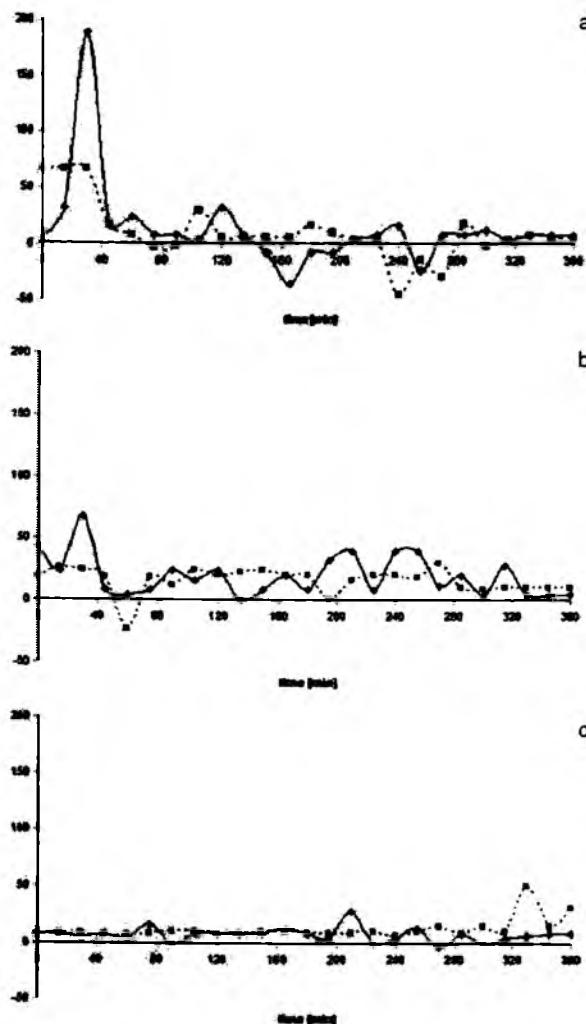


Figure 4

Comparison of the oscillations of the specific rotation of L-alanine dissolved in (a) ethanol–water 7:3, (v/v), (b) ethanol–1 M hydrochloric acid 7:3, (v/v), and (c) ethanol–1 M sodium hydroxide 7:3, (v/v) and stored for 360 min at $9 \pm 2^\circ\text{C}$, with (—) and without (---) ultrasonification.

demonstrate that L-alanine transesterifies in vitro to its D antimer. The experiments were performed with L-alanine dissolved in three mixed solvents – ethanol–water, ethanol–1 M HCl, and ethanol–1 M NaOH and then stored in small sealed vials for nine days at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. The initial concentration of L-alanine in each solvent was 5.61×10^{-2} M.

Figure 2 shows oscillatory changes of the retardation coefficient (R_F) as a function of time. These oscillations are evidence of structural inversion of L-alanine to its D antimer, because alanine cannot decompose under the mild storage conditions used and errors in the measurement of R_F never exceeded 0.02 units.

Changes of R_F for the amino acid dissolved in ethanol–water were in the range 0.40 ± 0.02 to 0.55 ± 0.02 . When the acid was dissolved in ethanol–1 M HCl the changes were in the range 0.43 ± 0.02 to 0.54 ± 0.02 and in ethanol–1 M NaOH the changes were in the range 0.32 ± 0.02 to 0.54 ± 0.02 . From these experimental data, graphically presented in Figure 2, it is apparent that the periodic changes of R_F always exceed the experimental error

by at least one order of magnitude, irrespective of the solvent used.

The oscillations of R_F are most pronounced for L-alanine dissolved in ethanol–1 M NaOH and least pronounced when the acid is dissolved in ethanol–1 M HCl. On the basis of:

- results from our previous studies with L-phenylalanine and L-tyrosine [11, 12];
- results published by Bhushan et al. [14] for analogous amino acids and the analogous TLC system; and
- the fact that average R_F values for alanine dissolved in ethanol–1 M HCl are the highest (with the acidic environment known to hamper keto–enol tautomerism)
- it can be deduced that the R_F value of the optically pure L-alanine (ca 0.54 ± 0.02) is higher than that of optically pure D-alanine (ca 0.32 ± 0.02).

The changing maxima and shapes of the concentration profiles for L-alanine dissolved in ethanol–1 M NaOH are shown as a sequence of six plots, meant as snapshots, in Figure 3. For the other two examples of L-alanine dissolved in ethanol–water and ethanol–1 M HCl the observed changes were analogous. The oscillatory chiral inversion of the alanine molecules in the solutions seems to occur rather fast so we were virtually unable to catch even one snapshot of the two separated bands of the racemic mixture. Instead, we observed either symmetric concentration profiles of the individual optically pure antimers or the slightly skewed concentration profiles showing strong quantitative predominance of one antimer over its mirror image.

Finally, the possibility that the oscillatory chiral inversion of L-alanine not only results from the time the compound is stored in the solvents but is also affected by the retention process and a direct contact of the chiral analyte with the components of the chromatographic system cannot be excluded.

3.2 Polarimetry

The specific rotation of the L-alanine solutions was measured at 9 ± 2 and $22 \pm 2^\circ\text{C}$ for 360 min at 15-min intervals. At each temperature, two independent measurements were obtained, one for the unmixed solution and the other for the solution mixed by ultrasonification.

In none of the solutions investigated did the specific rotation of L-alanine reach a stable value; oscillatory changes were always observed. These changes are regarded as being a result of oscillatory chiral inversion, although on some occasions the absolute values measured were much higher than those of the enantiomers investigated. It is, therefore, believed that the observed oscillations result both from chiral inversion occurring in solution and the physical effect of a special – e.g. cholesteric liquid crystalline – arrangement of the amino acid molecules in solution.

It was also established that the amplitude of these changes at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ was much lower than that at $9 \pm 2^\circ\text{C}$. This is certainly the effect of the greater viscosity of the samples kept at lower temperature, because high viscosity of the reaction medium is a well recognized promoter of many oscillatory processes. The results from measurement of the specific rotation at $9 \pm 2^\circ\text{C}$ are shown in Figure 4.

From these results it is apparent that the amplitude of the oscillations in the mixed L-alanine solutions is greater than in the

ids) to undergo spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion to their respective antimers. These results can be regarded as the discovery of a new class of oscillatory reaction occurring in vitro. In the chemical and biochemical literature reports of analogous processes occurring in vivo are abundant, and conviction of the catalytic role of enzymes and the other biologically active compounds of natural origin in these processes has been widespread. In view of our recent findings, it seems highly probable that the long-term conviction that these processes occur in vivo only is to a large extent unfounded and arbitrary, because all biochemical experiments are ultimately controlled in vitro and, moreover, it is rather impossible to claim that the chiral conversion proceeds under the action of biologically active compounds only if it can occur outside biological systems also, simply under the action of water and other low-molecular-weight solvents.

It was the objective of this study to expand our knowledge of other classes of α -propionic acid derivative able to undergo spontaneous in-vitro chiral conversion. From the experimental evidence already amassed it seems intuitive that this phenomenon is general in nature and inherent to virtually all α -propionic acid derivatives. Intuition alone is not sufficient, however, and we must expand the range of chiral compounds and compound classes investigated from the group of α -propionic acids to better judge the general nature of this chiral conversion. In this paper we describe the results of our study on the tendency of L-(+)-lactic acid (an α -hydroxypropionic acid of substantial biological importance) to undergo a spontaneous in-vitro chiral conversion.

Experimental

L-(+)-Lactic Acid

The structural formula of lactic acid is given in Fig. 1. In this study, we used L-(+)-lactic acid manufactured by Fluka (Buchs, Switzerland; #69771). Both in TLC experiments and polarimetry we used solutions of L-(+)-lactic acid dissolved in ethanol-water 7:3 (*v/v*), ethanol-glacial acetic acid 7:3 (*v/v*), and ethanol-basic buffer, pH 9, 7:3 (*v/v*). The concentration of L-(+)-lactic acid (50 g L^{-1} , $5.55 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$) was the same in each solution. TLC and polarimetric experiments were conducted on freshly prepared solutions.

cannot exclude partial contribution to the overall separation resulting from other copper-lactic acid chelate cations, e.g. $[\text{Cu}(\text{LA})]^{2+}$ and $[\text{Cu}(\text{LA})_3]^{2+}$.

The analyte samples were applied to the plates by use of an AS 30 auto-sampler (Desaga, Heidelberg, Germany). Nine 5- μL samples of the same solution were applied 2 cm apart 1.5 cm above the lower edge of the plate. One-dimensional development was then performed at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ with dioxane-water 9:1 (*v/v*) as mobile phase. Following the recommendation of Cecchi and Malaspina [7], the chromatograms were developed for 40 min and then dried at ambient temperature for 3 h. Finally, each chromatographic spot was densitometrically scanned in the direction of development.

TLC analysis of solutions of L-(+)-lactic acid in ethanol-water, ethanol-glacial acetic acid, and ethanol-basic buffer was performed at 30-min intervals for a period of 5 h, so in that time period ten consecutive chromatograms were obtained for each solution. Each experiment was repeated three times.

Densitograms were acquired with a Desaga (Heidelberg, Germany) model CD 60 densitometer equipped with Windows-compatible ProQuant software. Concentration profiles of the development lanes were recorded in reflectance mode, in ultraviolet (UV) light from the deuterium lamp, at $\lambda = 315 \text{ nm}$. This wavelength was experimentally chosen as that of maximum absorptivity of the Cu-LA complex on the chromatographic plate surface. The dimensions of the scanning rectangular light beam were $0.02 \text{ mm} \times 0.4 \text{ mm}$. Maxima of the respective concentration profiles were used for calculation of retardation coefficients, R_F .

The chromatograms were also scanned at $\lambda = 254 \text{ nm}$ by use of a Chromimage flat-bed scanner (AR2i, Le Plessis Robinson, France), to save the pictures of the whole chromatograms and of the individual chromatographic spots.

Polarimetry

Specific rotation ($[\alpha]_D$) was measured using a Carl Zeiss (Jena, Germany) Polamat A polarimeter. The optical path length of the measurement cell was exactly 10 cm (1 dm) and the volume of solution was ca 1 mL. Specific rotation was calculated using the equation:

$$[\alpha]_D = 100\alpha/cd \quad (3)$$

where α is the measured rotation (in angle degrees), D is the wavelength used (589 nm, which corresponds to the sodium D line), c is the concentration of the compound in g per 100 mL solution, and d is the measured sam-

ple thickness in dm. From the literature [8] it is known that the specific rotation of L-(+)-lactic acid at ambient temperature is 2.6° . We obtained an identical value for freshly prepared solutions of L-(+)-lactic acid.

Two different experiments were performed. The first experiment was performed for 32 days at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and changes in specific rotation of a solution of L-(+)-lactic acid in ethanol–water 7:3 (*v/v*) were recorded for several hours per day at 15-min intervals.

In the second experiment we used solutions of L-(+)-lactic acid in ethanol–water, ethanol–glacial acetic acid, and ethanol–basic buffer, pH 9 (each 7:3 *v/v*). These solutions were stored for 5 h at $9 \pm 2^\circ\text{C}$ and $22 \pm 2^\circ\text{C}$, and for each measurement temperature one sample was stirred by ultrasonication of the polarimetric measurement cell in a model RK 255H Sonorex Super (Bandelin, Berlin, Germany) ultrasonic bath while a parallel sample was kept unstirred. The specific rotation of each sample was measured at 15-min intervals.

Results and Discussion

Thin-Layer Chromatography (TLC)

The objective of this study was to collect experimental evidence proving the oscillatory chiral conversion of lactic acid, i.e. its continual changing from the L-(+) to the D-(−) species and vice versa. The TLC conditions used for separation of the enantiomers were those of Cecchi and Malaspina [7]. They were successfully applied in this study and enabled excellent baseline separation of the two lactic acid antimers, as shown in Figs 2a–2c. The D-(−)

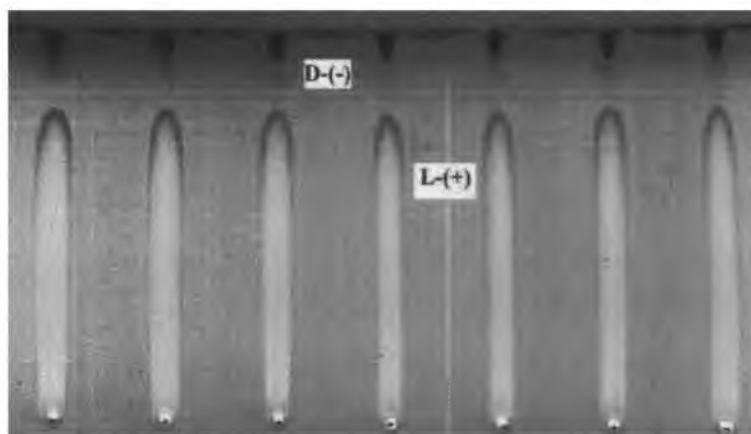


Fig. 2a.

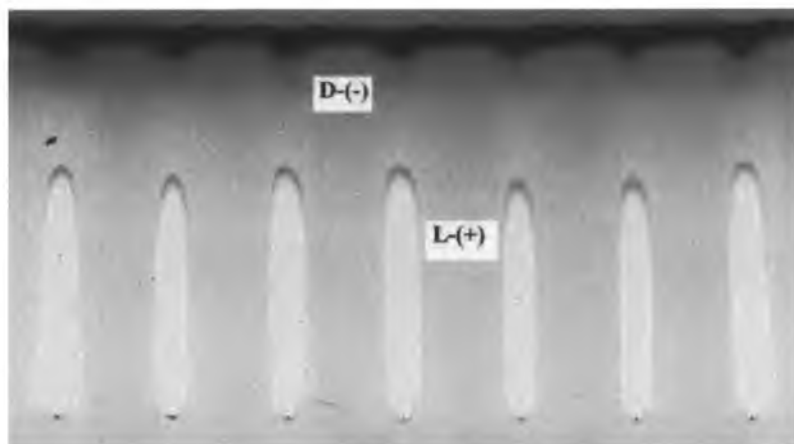


Fig. 2b.

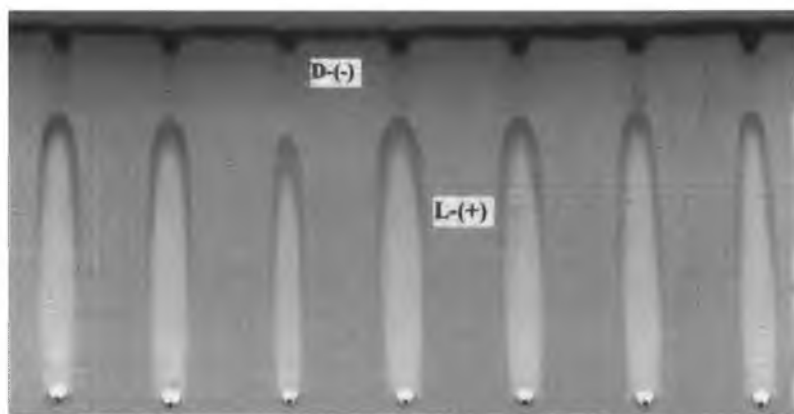


Fig. 2c.

Fig. 2. Chromatograms obtained for L-(+)-lactic acid dissolved in (a) ethanol–water 7:3 (v/v), (b) ethanol–glacial acetic acid 7:3 (v/v), and (c) ethanol–basic buffer, pH 9 7:3 (v/v)

species appeared as a navy blue spot just below the mobile-phase front and the L-(+) species was located on the upper tip of the swallow-shaped trail. Chromatograms reproduced in this study (Figs 2a–2c) bear a striking resemblance to the chromatogram presented by Cecchi and Malaspina [7].

The evident separation of the enantiomers of lactic acid shown in Fig. 2 was also confirmed by UV spectroscopy. We compared the UV spectra of the Cu^{2+} –lactic acid mixture (the aqueous solution prepared in the molar ra-

tio 1:2) with the UV spectra of the separated lactic acid antimers, densitometrically recorded on the chromatographic plate (in situ). The spectroscopic evidence is given in Fig. 3a, b. It is apparent from Fig. 3a that neither lactic acid nor copper(II) acetate absorbs in the UV range whereas the Cu^{2+} -lactic acid mixture prepared in 1:2 molar ratio has distinct absorption with a maximum at ca. 235 nm. The UV spectra of the separated enantiomers of lactic acid recorded in-situ on the plate (Fig. 3b) resemble that in Fig. 3a (the spectrum of the Cu^{2+} -LA complex) but their maxima are shifted toward higher wavelengths. This shift is probably because of:

- (i) a bathochromic effect induced by intermolecular interactions of the copper(II)-LA complexes with silica gel, and/or
- (ii) differences between the structures of the Cu^{2+} -LA complexes, depending on the antimer.

The in-situ absorption maximum for the Cu^{2+} -D-(-)-LA complex appears at ca. 275 nm and that for the Cu^{2+} -L-(+)-LA complex is at ca. 290 nm.

The chromatograms shown in Figs 2a-2c were obtained from freshly prepared solutions of L-(+)-lactic acid in neutral, acidic, and basic solvents, respectively, and yet - surprisingly enough - they clearly show separated enantiomers of L-(+) and D-(-)-lactic acid. The TLC experiment alone cannot provide a fully reliable answer to the question of whether racemization of L-(+)-lactic acid occurred instantaneously after dissolution or during the chromatographic process. It seems most probable, however, that intermo-

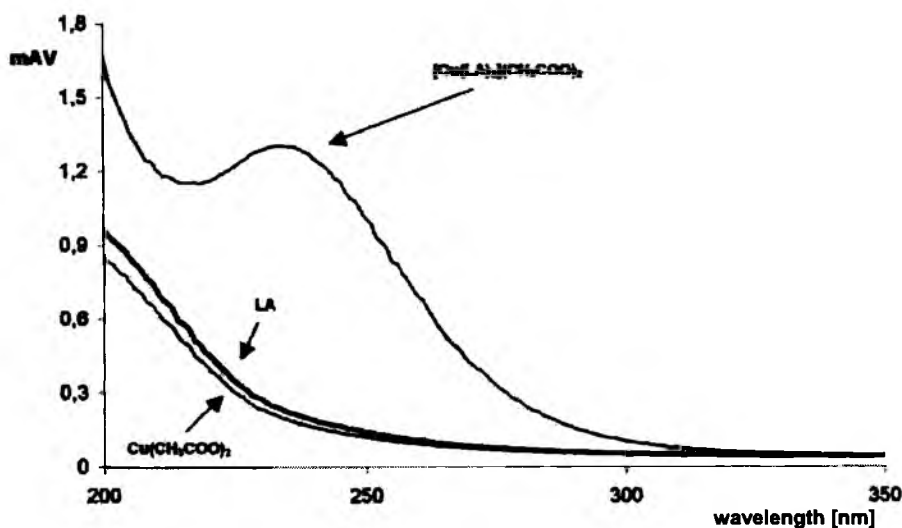


Fig. 3a.

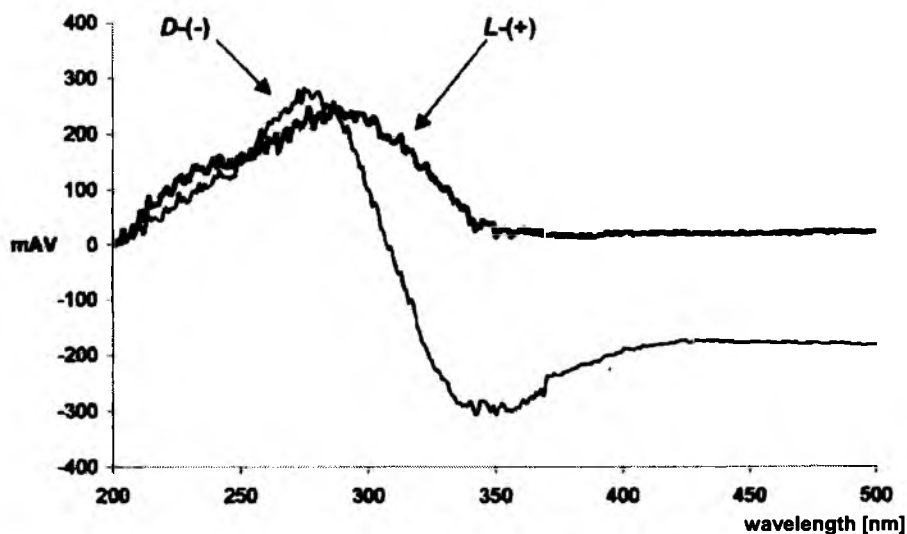
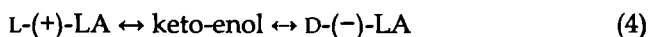


Fig. 3b.

Fig. 3. (a) UV spectra of L-(+)-lactic acid, LA ($5.55 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$), $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ($5.01 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), and $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ + LA mixture in the molar ratio 1:2, recorded by UV spectroscopy of solutions. (b) UV spectra of L-(+)- and D-(-)-lactic acid recorded in situ by use of the densitometer

lecular interactions between the chiral analyte and the adsorbent greatly accelerate the process of chiral conversion which, in a simplified version, can be given by eq. (4) [1-6] and involves formation from lactic acid of a keto-enol intermediate between the two chiral antipodes:



A similar, i.e. almost instantaneous, chiral conversion of the analyte under the catalytic effect of the silica gel surface was reported in our study devoted to the oscillatory transesterification of *S*-(+) and *R*-(-)-flurbiprofen [5].

Fig. 4 shows a typical densitogram recorded from a chromatographic plate. In its general nature this densitogram is representative of separations of the enantiomers of samples of lactic acid dissolved in ethanol-water, ethanol-glacial acetic acid, and ethanol-basic buffer. These densitograms have two important features. First, they show the two fully separated enantiomers and, second, the D-(-)-lactic acid peaks partially overlap those of unknown contaminants washed from the chromatographic plate during

predevelopment and present on the line of the mobile-phase front. To better visualize the presence of D-(–)-lactic acid, we scanned the chromatographic plates in a direction perpendicular to that of the mobile phase migration at a plate height corresponding approximately to the maxima of the D-(–)-lactic acid concentration profile. Fig. 5 shows a row of D-(–)-lactic acid concentration profiles from different lanes as they appear side by side just below the mobile-phase front on the chromatograms.

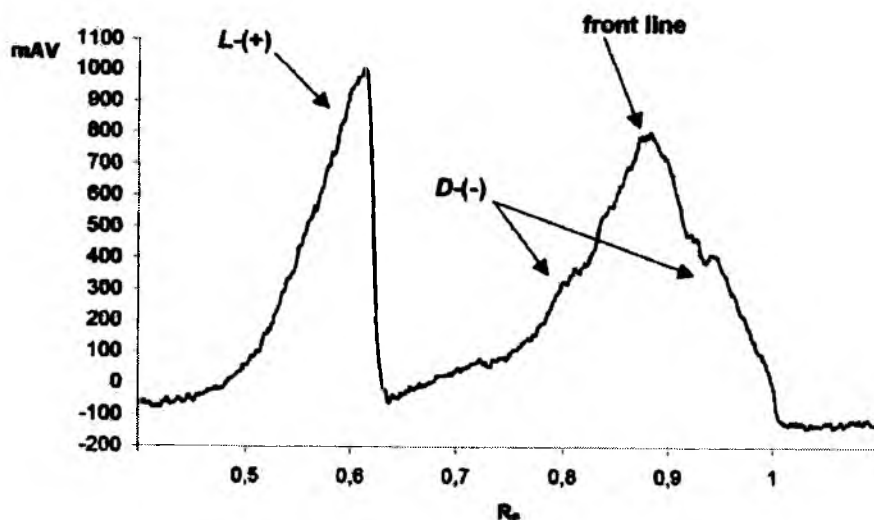


Fig. 4. Densitogram obtained from the separated enantiomers of lactic acid. It is apparent that (i) baseline separation of the two enantiomers is achieved, and (ii) the peak of D-(–)-lactic acid partially overlaps those of contaminants just below the mobile-phase front

Fig. 6a–6c show the oscillatory changes of the retardation coefficient (R_F) as a function of time for the L-(+) and D-(–) antimers of lactic acid dissolved in the three different mixed solvents and stored for 5 h at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. These oscillations certainly mirror structural conversion of L-(+)-lactic acid to its D-(–) antimer and vice versa, because lactic acid does not undergo structural decomposition under these conditions and experimental error in the R_F value never exceeds 0.02. These oscillations seem good proof that structural conversion of lactic acid occurs in the course of development of the chromatograms, because otherwise – i.e. if it were complete before the chromatographic process – we would not observe oscillatory changes of the $R_{F(L)}$ and $R_{F(D)}$ values as a function of time.

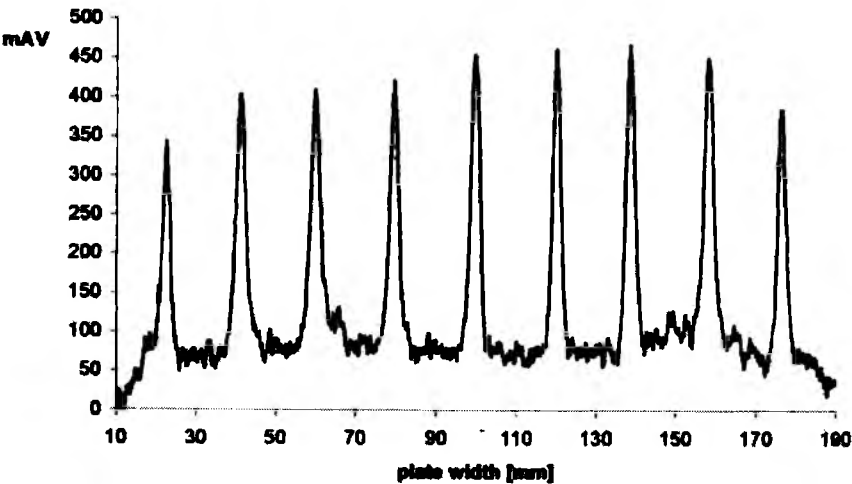


Fig. 5. Densitogram scanned just below the mobile-phase front of the chromatogram (the chromatogram was similar to those shown in Figs 2a–2c) in a direction perpendicular to that of development, showing concentration profiles of D-(+)-lactic acid without interference from the contaminants on the mobile-phase front

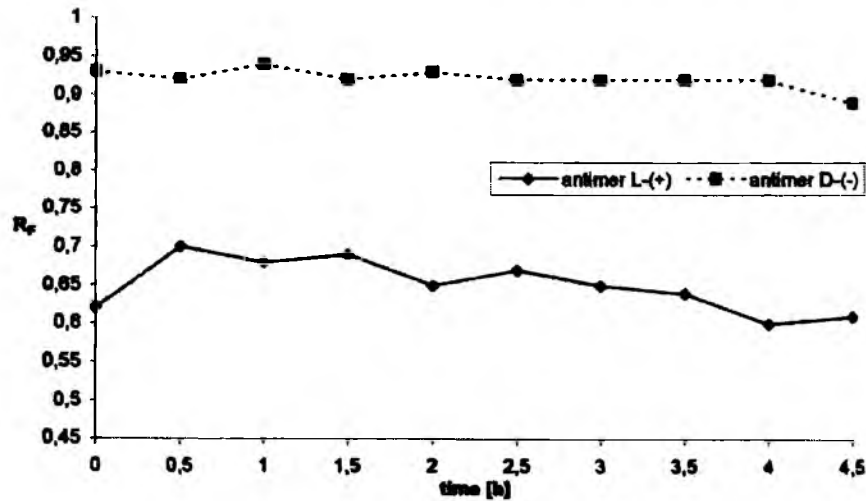


Fig. 6a.

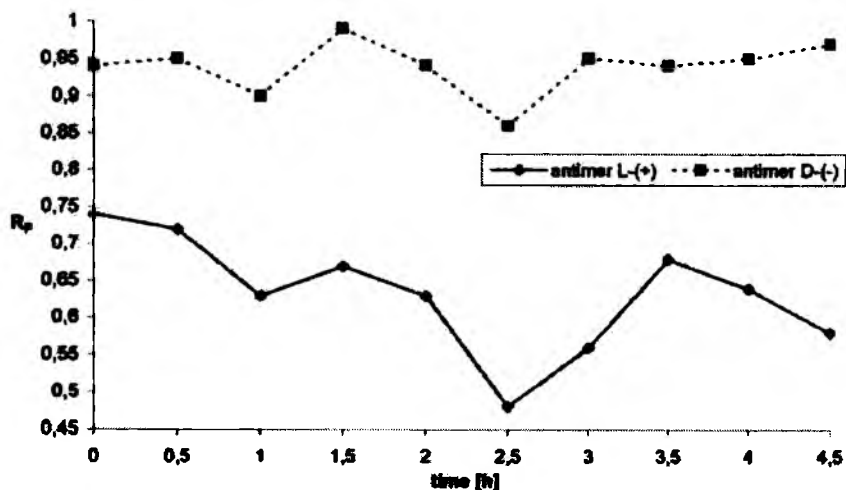


Fig. 6b.

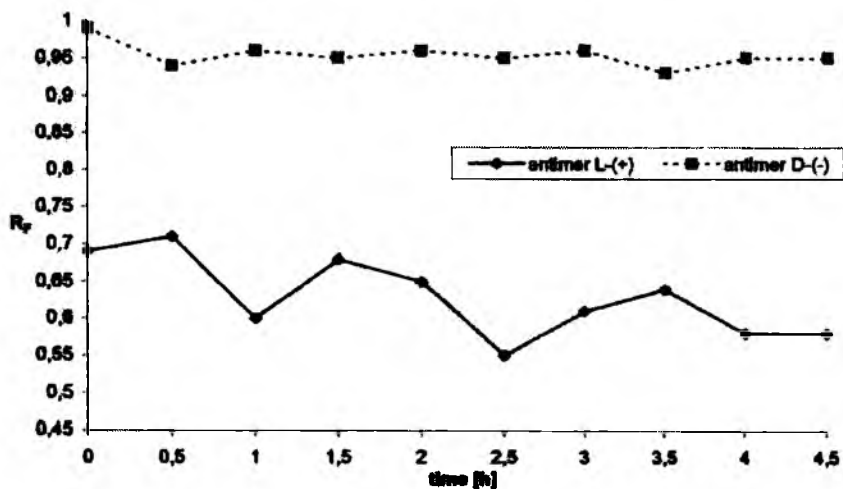


Fig. 6c.

Fig. 6. Dependence on storage time at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ of the retardation coefficient ($R_F = f(t)$) for L-(+)-lactic acid dissolved in (a) ethanol-water, (b) ethanol-glacial acetic acid, and (c) ethanol-basic buffer

For ethanol-water the R_F values of the L-(+) and the D-(-) antimers oscillated within the ranges 0.60 ± 0.02 to 0.70 ± 0.02 and 0.89 ± 0.02 to 0.94 ± 0.02 , respectively. For ethanol-glacial acetic acid the analogous ranges of R_F oscillation were 0.48 ± 0.02 to 0.74 ± 0.02 for the L-(+) species and 0.86 ± 0.02 to 0.97 ± 0.02 for the D-(-) species. For ethanol-basic buffer the

R_F values of the L-(+) and D-(-) antimers oscillated within the ranges 0.55 ± 0.02 to 0.71 ± 0.02 and 0.93 ± 0.02 to 0.97 ± 0.02 , respectively.

It is apparent from Fig. 6 and, more specifically, from the ranges of R_F oscillation, that the changes observed substantially exceed experimental error. The greatest difference among the R_F values of L-(+)-lactic acid ($\Delta R_{F(L)} = 0.26$) was observed for the sample dissolved in ethanol-glacial acetic acid; the smallest was for the sample dissolved in ethanol-water ($\Delta R_{F(L)} = 0.10$). Analogous values for D-(-)-lactic acid ($\Delta R_{F(D)}$) were much smaller, evidently because the D-(-) species migrated very close to the mobile-phase front. Greater mobility of the D-(-) species is good proof that its ability to complex with Cu^{2+} ions is lower than that of the L-(+) antimer (i.e. $K_2 < K_1$). Even the smallest difference between the R_F values of the L-(+) and the D-(-) species, $\Delta R_F = R_{F(D)} - R_{F(L)} = 0.12$, is excellent proof that the method used for separation of the enantiomers [7] performs very well.

Polarimetry

Changes in the specific rotation, $[\alpha]_D$, of the solution of L-(+)-lactic acid in ethanol-water stored for 32 days at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ were recorded for several hours a day at 15-min intervals. The results obtained are shown in Fig. 7.

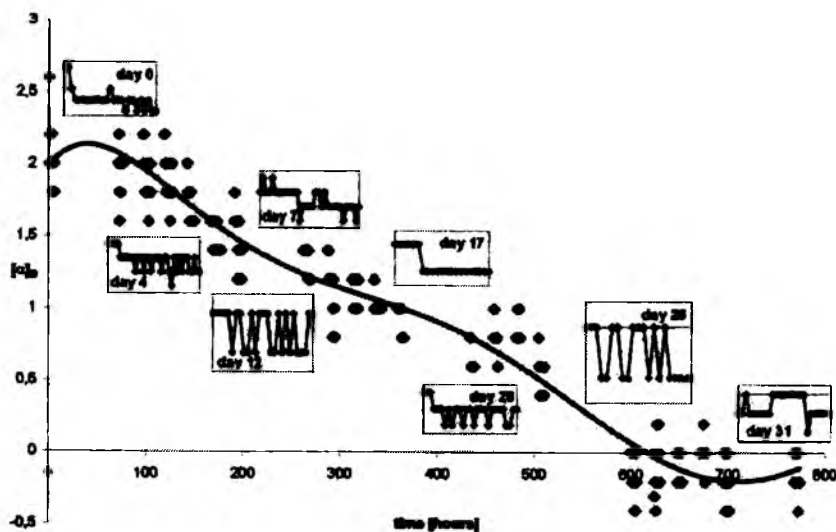


Fig. 7. Oscillatory changes of the specific rotation of a solution of L-(+)-lactic acid in ethanol-water as a function of storage time at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. The general trend of the changes is indicated by the solid line and insets show the changes on selected days of the experiment

From the shape of the plots in Fig. 7 two features of the behaviour of the specific rotation are clearly visible. First, changes of the specific rotation were oscillatory in nature and, second, the long-term trend of these changes was toward zero, indicating full racemization of the L-(+)-lactic acid after ca 600 h (i.e. ca. 25 days). The plots shown in Fig. 7 fully resemble those reflecting changes in the specific rotation of S-(+)-flurbiprofen and S-(+)-ketoprofen [3, 4].

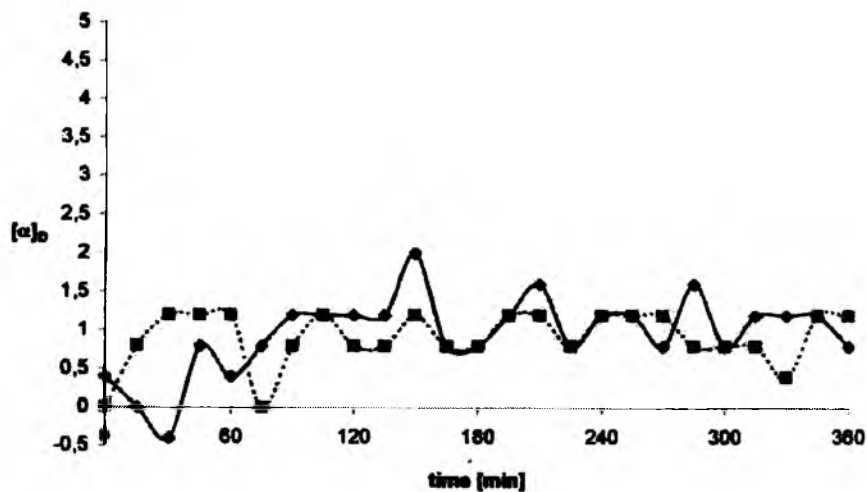


Fig. 8a.

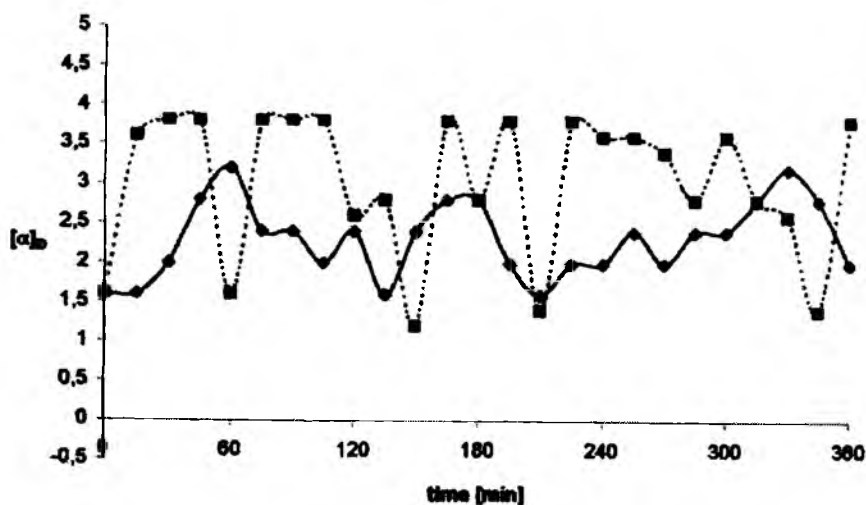


Fig. 8b.

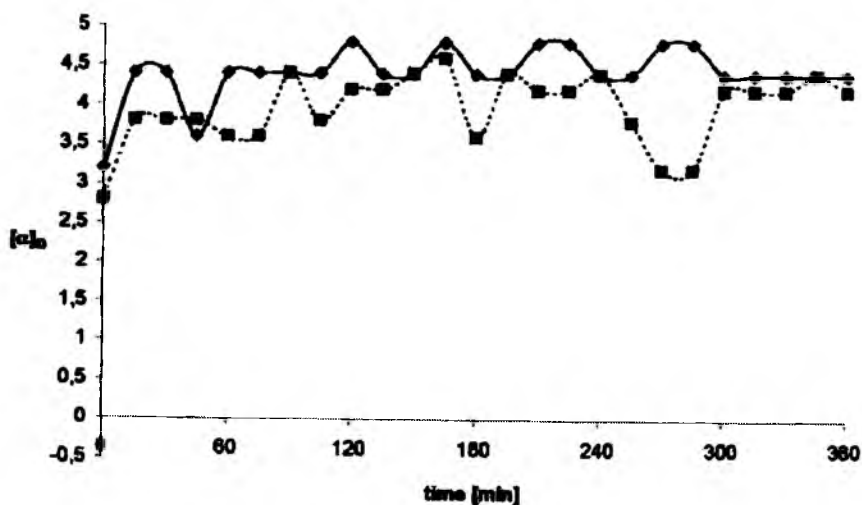


Fig. 8c.

Fig. 8. Comparison of the oscillatory change of specific rotation as a function of sample storage time at $9 \pm 2^\circ\text{C}$ for L-(+)-lactic acid dissolved in: (a) ethanol-water, (b) ethanol-glacial acetic acid, and (c) ethanol-basic buffer. Results for the ultrasonicated and unstirred samples are indicated by solid and dashed lines, respectively

The specific rotation of the L-(+)-lactic acid solutions was measured at two different temperatures, $9 \pm 2^\circ\text{C}$ and $22 \pm 2^\circ\text{C}$. At each temperature, two parallel measurements were performed, one for solution stirred by ultrasonication and the other for unstirred solution. In none of the solutions investigated was the specific rotation stable as a function of time. Instead, the oscillatory changes of the specific rotation were observed all the time throughout the course of the experiment. The amplitude of these changes was lower at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ than at $9 \pm 2^\circ\text{C}$ and for this reason in Figs 8a–8c we show the more pronounced results, those obtained at the lower temperature.

From the shape of the plots shown in Fig. 8 it can be concluded that stirring of the investigated samples does not strongly affect the amplitude of the oscillations in comparison with the unstirred samples. This conclusion applies best to the plots shown in Figs 8a and 8c, i.e. to the samples of L-(+)-lactic acid dissolved in ethanol-water and ethanol-basic buffer. For L-(+)-lactic acid dissolved in ethanol-glacial acetic acid (Fig. 8b) it can be seen that the amplitude of the oscillations for ultrasonicated sample is lower than that for the unstirred sample.

Let us consider the effect of the solvent on the oscillations. It is readily apparent that the amplitude of the oscillation is highest for ethanol-glacial

acetic acid (Fig. 8b) and much lower for the other two solvent mixtures (Figs 8a and 8c). It is, perhaps, worthy of note that a similar dependence of amplitude of $[\alpha]_D$ oscillations on solvent composition was reported for S-(+)-ketoprofen [9].

Now let us reflect on a real meaning of the polarimetric measurements and the numerical results plotted in Figs 8a–8c. In these measurements the samples are a bulk phase not affected by solid-liquid interface phenomena, in contrast with the catalytic effect of the stationary phase in the TLC experiments. The polarimetrically recorded changes of the specific rotation are twofold in nature:

- (i) because of chiral conversion of the compound considered, and
- (ii) because of physical phenomena, consisting in specific arrangement of the investigated molecules within the supramolecular structures.

In (i), we should expect a decrease of $[\alpha]_D$ for the (+) species and an increase of $[\alpha]_D$ for the (–) species, as chiral conversion pushes the compound of interest toward racemization, and for the racemate $[\alpha]_D = 0$. In (ii) we can expect an increase of $[\alpha]_D$ much greater than 360° , because of spiral rotation of the plane-polarized light by specifically arranged chiral molecules in the self-organized (e.g. by hydrogen-bonding) supramolecular structures.

The specific rotation of L-(+)-lactic acid cited in the literature [8] and measured in our laboratory is 2.6° . The results plotted in Fig. 8a clearly show that in the ethanol–water solution stored at $9 \pm 2^\circ\text{C}$ the $[\alpha]_D$ value decreases rapidly to zero and even to sporadic negative values. This behaviour is indicative of oscillatory chiral conversion of L-(+)-lactic acid to its D-(–) antimer effectively occurring outside the TLC system. Storage of L-(+)-lactic acid in ethanol–glacial acetic acid (Fig. 8b) results in oscillatory changes of $[\alpha]_D$ in the range from 1.2° to 3.8° , which is below and above the 2.6° level. This result is indicative of the oscillatory chiral conversion of L-(+)-lactic acid to its D-(–) antimer in this bulk liquid phase (which is a chemical process) and also of supramolecular physical effects (apparent from the oscillations of $[\alpha]_D$ in the range from 2.6° to 3.8°). Storage of L-(+)-lactic acid in ethanol–basic buffer (Fig. 8c) results in oscillation of $[\alpha]_D$ entirely above the 2.6° level (and most frequently between 3.2° and 4.8°). This result indicates that, in contrast with the TLC system, L-(+)-lactic acid stored in the bulk ethanol–basic buffer does not undergo the oscillatory chiral conversion, and that the observed oscillations are solely a result of changes in the arrangement of the supramolecular aggregates of L-(+)-lactic acid, which is a physical phenomenon.

Conclusions

These thin-layer chromatographic and polarimetric results confirm that chiral conversion of L-(+)-lactic acid occurs in low-molecular-weight solvents. It is also evident that the dynamics of this process are different in TLC systems and in bulk liquid phases. Chiral conversion occurring in the TLC systems is rapid, irrespective of the binary solvent employed, and racemization of L-(+)-lactic acid is approximately complete within one development. In contrast, the chiral conversion occurring in the bulk liquid phases is a slower process, and for L-(+)-lactic acid dissolved in ethanol-water and stored at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ is complete only after ca 25 days. During storage at $9 \pm 2^\circ\text{C}$ chiral conversion of L-(+)-lactic acid occurs in ethanol-water and ethanol-glacial acetic acid only; in ethanol-basic buffer the process most probably does not occur.

Our TLC experiments confirmed the excellent performance of the procedure elaborated by Cecchi and Malaspina [7] for separation of the enantiomers of lactic acid.

Acknowledgement

The authors wish to thank Merck KGaA (Darmstadt, Germany) for supplying the TLC plates used in our experiments. The authors also wish to thank the AR2i Company (Le Plessis Robinson, France) for supplying the Chromimage video densitometer and the Galaxie-TLC software used in the study.

References

- [1] M. Sajewicz, R. Piętko, A. Pieniak, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **15**, 131–149 (2005)
- [2] M. Sajewicz, R. Piętko, A. Pieniak, and T. Kowalska, *J. Chromatogr. Sci.*, **43**, 542–548 (2005)
- [3] M. Sajewicz, R. Piętko, A. Pieniak, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **29**, 2059–2069 (2006)
- [4] M. Sajewicz, R. Piętko, G. Drabik, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **29**, 2071–2082 (2006)
- [5] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, Ł. Wojtal, G. Grygierczyk, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **18**, 226–237 (2007)
- [6] M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, and T. Kowalska, *J. Planar Chromatogr.*, **21**, 43–47 (2008)
- [7] L. Cecchi and P. Malaspina, *Anal. Biochem.*, **192**, 219–221 (1991)

- [8] R.E. Kirk, D.F. Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Vol. 8, p. 168, The Interscience Encyclopedia, New York, 1952
- [9] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, and T. Kowalska, Thin Layer Chromatographic and Polarimetric Investigation of the Oscillatory in vitro Chiral Inversion of S-(+)-Ketoprofen, J. Planar Chromatogr., submitted for publication

Experimental and Model Investigation of the Oscillatory Transenantiomerization of *L*- α -Phenylalanine

Mieczysław Sajewicz,¹ Monika Gontarska,¹
Łukasz Wojtal,¹ Dorota Kronenbach,¹ Marcin
Leda,² Irving R. Epstein,² and Teresa Kowalska¹

¹Institute of Chemistry, University of Silesia, Katowice, Poland

²Chemistry Department, Brandeis University,
Waltham, MA, USA

Abstract: In an earlier study, we obtained experimental evidence of the oscillatory transenantiomerization of selected profen drugs (e.g., *S*-(+)-ibuprofen, *S*-(+)-naproxen, and *S*-(+) and *R*-(-)-flurbiprofen) dissolved in aqueous, aqueous-organic, and purely organic liquid media. This process was apparently catalyzed by basic or amphiprotic environments and involved keto-enol tautomerism, and the self-organization of molecules in the solution via association of the carboxylic functional group of profens through hydrogen bonding to form mixed H-bonded associates with the remaining constituents of the solution. A model of the oscillatory transenantiomerization of profens was also developed by adapting an earlier oscillatory model, the Templator. Our new model comprises two linked Templators. The essence of the Templator model adapted to the oscillatory transenantiomerization of profens is the assumption that the H-bonded profen homodimer acts as a template, able to generate new dimers having the same steric configuration as their respective monomeric units.

As profens belong to the class of 2-arylpropionic acids (2-APAs), we concluded that the phenomenon of oscillatory transenantiomerization may occur in other 2-APAs as well, among them those amino acids whose molecular structure can formally be derived from propionic acid. Thus, in this study, we

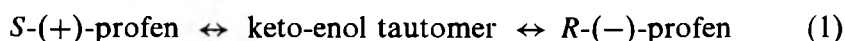
Address correspondence to Teresa Kowalska, Institute of Chemistry, University of Silesia, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland. E-mail: kowalska@us.edu.pl

focus our attention on *L*- α -phenylalanine (LPA; one of the nine amino acids essential for humans). Using thin layer chromatography (TLC) and polarimetry, we demonstrate the ability of LPA to undergo oscillatory transepiomerization analogous to that observed with profens. The self-organization of molecules in a 70% ethanol solution of LPA is confirmed with photographs taken in UV light ($\lambda = 254\text{ nm}$). Finally, we propose a skeleton molecular mechanism for the transepiomerization of LPA and simulate the oscillatory interconversion of its *L* and *D* forms with two linked Templators.

Keywords: Keto-enol tautomerism; *L*- α -phenylalanine; LPA; Oscillatory transepiomerization; Polarimetry; Templator; TLC.

INTRODUCTION

In our earlier studies, we have reported on the oscillatory transepiomerization of selected profen drugs in aqueous, aqueous-organic, and purely organic solvents.^[1-3] We proposed a mechanism for their structural conversion via keto-enol tautomerism, and we provided experimental evidence of the catalytic role of basic environments in this conversion.^[4] In chemical terms, profen drugs belong to the class of 2-arylpropionic acid (2-APAs), and their chirality center is located on the α -C atom of the acid molecule. Schematically, structural conversion of profens is shown in the following scheme:



In addition to profens, many other compounds belong to the class of 2-arylpropionic acids, among them those α -amino acids whose structure can, formally at least, be derived from propionic acid. Thus, in the first instance, we focused our attention on *L*- α -phenylalanine (LPA), one of the nine amino acids essential for humans. We were curious to know whether *L*- α -phenylalanine can, when dissolved in certain solvents, undergo an analogous oscillatory transepiomerization to *D*- α -phenylalanine (DPA), as is the case with profens. In other words, we wanted to establish whether reaction (2) can take place in aqueous-organic solutions of *L*- α -phenylalanine in an oscillatory manner:



The results obtained in our study demonstrate that *L*- α -phenylalanine dissolved in low molecular weight solvents undergoes structural conversion to its *D* form with an ease similar to that of the earlier investigated profens.

EXPERIMENTAL

L- α -Phenylalanine

The chemical structure of *L*- α -phenylalanine is given in Fig. 1. Its isoelectric point pI is 5.48. In our study, we used *L*- α -phenylalanine purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany; cat. #1.07256.0025). In the thin-layer chromatographic experiments, we used solutions of *L*- α -phenylalanine in ethanol-water (7:3, v/v), ethanol-basic buffer, $pH = 9$ (7:3, v/v), and ethanol-glacial acetic acid (7:3, v/v), its concentration always being equal to 1 mg mL^{-1} (ca. $6.1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). The *L*- α -phenylalanine solutions were stored for 8 days at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ in order to trace the oscillatory transenantiomerization. At certain time intervals, the solution samples were analyzed by TLC.

In the polarimetric experiment, we used the analogous three types of *L*- α -phenylalanine solutions, with the amino acid concentration always equal to 5 mg mL^{-1} (ca. $3.03 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$).

Polarimetric Measurements of the Specific Rotation $[\alpha]_D$

Measurements of the specific rotation ($[\alpha]_D$) of *L*- α -phenylalanine solutions in ethanol-water, ethanol-basic buffer, and ethanol-glacial acetic acid mixtures were carried out at $9 \pm 2^\circ\text{C}$ and $22 \pm 2^\circ\text{C}$ for 240 min (in 10-min intervals), with and without stirring (by ultrasonication of the measuring cell). Ultrasonication was performed with a model RK 255H Sonorex Super (Bandelin, Berlin, Germany) ultrasonication bath. Measurements of the specific rotation were carried out with a Polamat

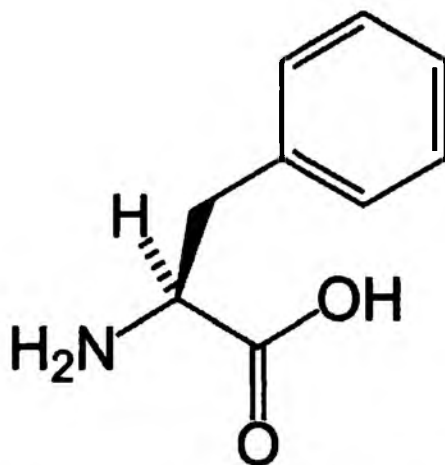


Figure 1. Chemical structure of *L*- α -phenylalanine.

A model polarimeter (manufactured by Carl Zeiss, Jena, Germany). The optical path length of the measuring cell was exactly 10 cm (=1 dm), and its volume was ca. 1 mL. The specific rotation $[\alpha]_D$ was calculated as

$$[\alpha]_D = 100\alpha/cd \quad (3)$$

where α is the measured rotation (in degrees); D is the wavelength employed, $\lambda = 589$ nm, which corresponds to the sodium D line; c is the concentration of a given compound in g (100 mL)⁻¹ solution; and d is the sample thickness in dm.

From the literature^[5] it is known that specific rotation ($[\alpha]_D$) of L - α -phenylalanine at 20°C is ca. -34°.

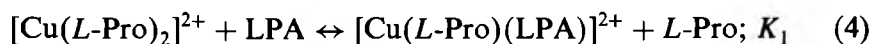
Commercial TLC Silica Gel Layers and Their Pretreatment

TLC was performed on commercial glass plates (20 cm × 20 cm) precoated with 0.25 mm layers of silica gel 60 F₂₅₄ (Merck KGaA, Darmstadt, Germany; cat. #1.05715). Before use, the plates were carefully washed by predevelopment with methanol-water, 9:1 (v/v), and then dried at ambient temperature (22 ± 2°C) for 3 h.

The washed and dried plates were then twice impregnated by conventional dipping for 2 s. The first solution used for impregnation was a 2.39×10^{-2} M aqueous solution of CuSO₄ (analytical grade; POCh, Gliwice, Poland). After the first impregnation, the plates were dried for 10 min at 105–110°C in a thermostatted chamber. The second solution used for impregnation was 3.04×10^{-2} M L -proline (L -Pro; Merck; cat. #1.07434.0010) in a water-methanol mixture (9:1, v/v). It is noteworthy that the molar ratio of Cu²⁺ cations to L -Pro molecules deposited on the chromatographic plates was 1:2, allowing the *in situ* formation of the [Cu(L -Pro)₂]²⁺ complex. After the second impregnation, the plates were dried again at ambient temperature for 3 h. Finally, the impregnated adsorbent layers were ready for chromatography.

Mobile Phase and Development of Thin Layer Chromatograms

Development of the stored L - α -phenylalanine (LPA) samples was carried out at 22 ± 2°C for a distance of 15 cm in the one-dimensional mode using a ternary mobile phase composed of *n*-butanol (*n*-BuOH)-acetonitrile (ACN)-water (H₂O) in the proportion 6:2:3 (v/v). The anticipated mechanism of retention with each of the two α -phenylalanine (PA) enantiomers LPA and DPA is given below:



The above mechanism of enantioseparation is known as ligand exchange chromatography (or complexation chromatography). The TLC procedure employed in this study was adapted from that developed by Bhushan et al.^[6] to use commercially precoated chromatographic glass plates in place of the laboratory-coated ones used earlier.

Sample application to the plates was performed with an autosampler (AS 30, Desaga, Heidelberg, Germany). The α -phenylalanine solutions were applied to the plate 1.5 cm above the lower edge of the plate in aliquots of 5 μ L spot⁻¹. Nine samples at equal distances of 2 cm from one another were applied per plate, and then the chromatogram was developed in the one-dimensional ascending mode. After development, the plates were dried at ambient temperature for 3 h, and each development track was densitometrically scanned in 1-mm intervals at a width of 1 cm in the direction of development. Each experiment was carried out on two plates; thus each numerical result given in this paper is a mean obtained from 18 individual development lanes.

Densitometric Assessment of the Thin Layer Chromatograms

Densitograms were acquired with a Desaga (Heidelberg, Germany) Model CD 60 densitometer equipped with Windows-compatible ProQuant software. Concentration profiles of the development lanes for α -phenylalanine were recorded in ultraviolet (UV) light from a deuterium lamp (in the reflectance mode) at 200 nm. The dimensions of the rectangular light beam were 2.0 mm \times 0.1 mm. The maxima of the concentration profiles were used for calculation of R_F values.

Photography

A colorless, apparently homogeneous, and perfectly transparent solution of *L*- α -phenylalanine in the ethanol-water mixture, 7:3, v/v (3.03×10^{-2} mol L⁻¹) was poured onto a watchglass, illuminated in the dark chamber used for visualization of the thin layer chromatograms with UV light ($\lambda = 254$ nm), and photographed with an amateur digital camera to reveal the lack of homogeneity, imperceptible in daylight, of the *L*- α -phenylalanine solution.

RESULTS AND DISCUSSION

Thin Layer Chromatography

One of the most efficient separation techniques, chromatography can provide direct proof of structural conversion of a given enantiomer to its

mirror image, as it can enantioseparate the two species and in that way demonstrate their coexistence. TLC, with its simplicity and robustness, has in its arsenal a number of effective methods of enantioseparating amino acids, including *L*, *D*- α -phenylalanine. In this study, we benefited from the TLC method elaborated by Bhushan et al.^[6] and adapted here to employ commercial chromatographic plates.

The aim of our TLC experiments was to gather evidence of the occurrence of the oscillatory transesterification of *L*- α -phenylalanine to its *D*-form, with *L*- α -phenylalanine samples dissolved in the three different mixed solvents (i.e., ethanol-water, ethanol-basic buffer, pH = 9, and ethanol-glacial acetic acid, 7:3 (v/v)), and then stored for eight days at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. As in our earlier studies on the oscillatory transesterification of selected profens, described in papers,^[1-3] the *L*- α -phenylalanine concentration in the freshly made solutions was kept low (ca. $6.1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) in order to facilitate enantioseparation and to obtain well-defined Gaussian concentration profiles of the separated analytes.

In Fig. 2, we show the oscillatory changes of the retardation factor (R_F) with the three different *L*- α -phenylalanine solutions stored at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ for eight days. These oscillatory changes demonstrate the structural conversion of *L*- α -phenylalanine to the *D* antimer, as the amino acid does not decompose under the storage conditions employed and the experimental error of the retardation factor (R_F) measurements

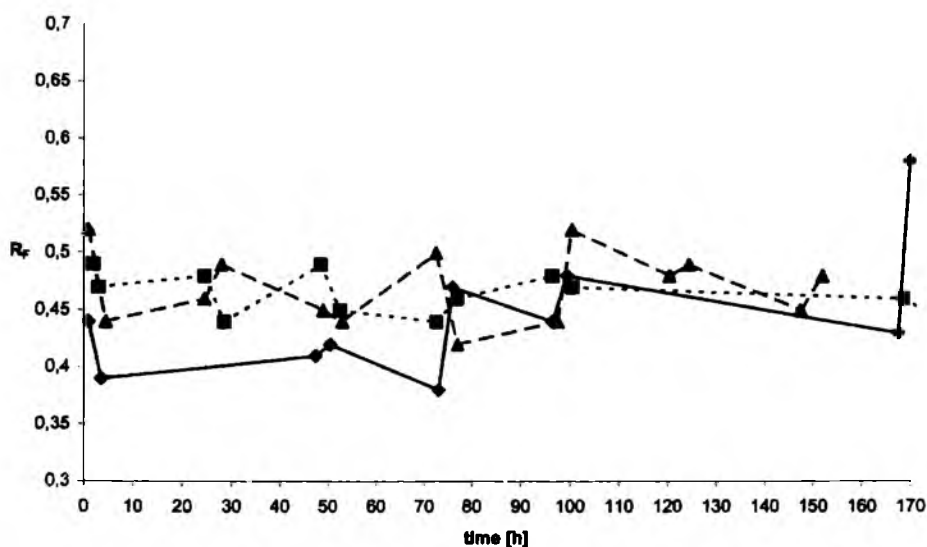


Figure 2. Dependence of retention, R_F , for *L*- α -phenylalanine dissolved in (♦) ethanol – water, 7:3 (v/v); (■) ethanol – basic buffer, pH = 9, 7:3 (v/v); and (▲) ethanol – glacial acetic acid, 7:3 (v/v), on sample storage time ($R_F = f(t)$) at $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

never exceeds $\pm 0.02 R_F$ units. The R_F values of the peak maxima for the analyte dissolved in the ethanol-aqueous medium oscillated between 0.58 ± 0.02 and 0.37 ± 0.02 . For the analyte dissolved in the ethanol-basic buffer, the R_F values of the peak maxima oscillated between 0.49 ± 0.02 and 0.42 ± 0.02 , and for the same analyte dissolved in the ethanol-glacial acetic acid, the analogous values oscillated between 0.52 ± 0.02 and 0.42 ± 0.02 . As can be seen from the three plots shown in Fig. 2, in each stored solution the oscillations of the R_F value significantly surpass the measuring error.

For the sake of comparison, we recall the analogous results of Bhushan et al.,^[6] in which the chromatographic system (in a variation of the version employed in this study) was first introduced. The R_F value reported there for *L*- α -phenylalanine was 0.39 and that for the *D* antimer was 0.32. The R_F values obtained in our modified chromatographic system are somewhat higher than in the original system, and the peak resolution in the original system ($\Delta R_F = 0.07$) was less than the difference between the extremal peak positions observed in the modified system (ΔR_F up to 0.21, as observed for α -phenylalanine stored in the ethanol-aqueous medium).

The highest average level of R_F is observed for the ethanol-glacial acetic acid mixture, and the lowest is found in the ethanol-water mixture. The TLC results confirm the role played by acidic and basic environments in the process of transenantiomerization. Namely, from earlier studies,^[6] it is known that, in this chromatographic system, the R_F values for *L*- α -phenylalanine are higher than those for its *D* antimer. The higher average R_F values observed for *L*- α -phenylalanine stored in ethanol-glacial acetic acid imply that the degree of steric conversion in this solvent is lower than in ethanol-basic buffer or in ethanol-water (i.e., glacial acetic acid hampers transenantiomerization, whereas basic and amphiprotic environments exert a catalytic effect).

A simultaneous demonstration of the changing maximum positions and shapes of the concentration profiles for the sample stored in the amphiprotic ethanol-water mixture is presented as a sequence of snapshots in Figs. 3(a)–(f). For the ethanol-basic buffer and the ethanol-glacial acetic acid, the changing peak positions are analogous to the ethanol – water case. However, only in the ethanol-water solvent did we obtain an occasional (and partial) enantioseparation of the two amino acid antimers.

Why do we consider the changing positions of the analyte's maximum R_F values and the changing shapes of its concentration profile as the most convincing demonstration of the oscillatory transenantiomerization of 2-APAs? Because our experience suggests that the oscillatory structural conversion of amino acid (and also profen)

F3

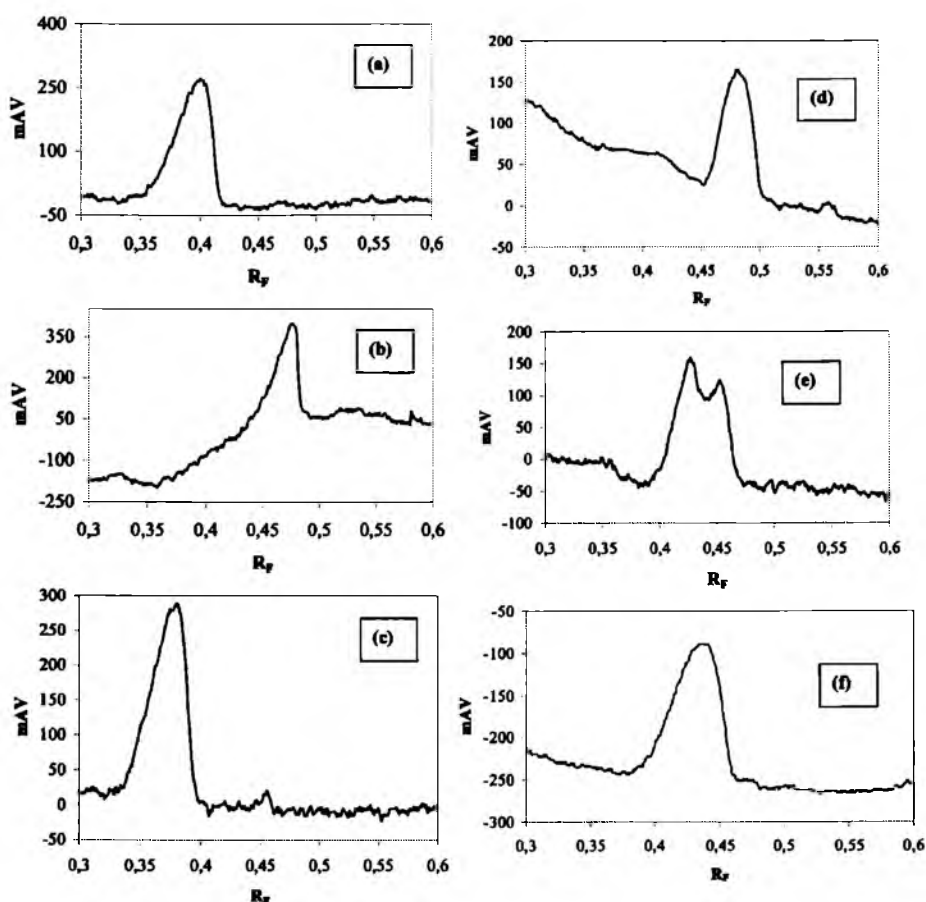


Figure 3. Sequence of densitometric concentration profiles for the *L*- α -phenylalanine solution in ethanol – water, 7:3 (v/v) after (a) 47.5 h; (b) 50.5 h; (c) 73 h; (d) 96.5 h; (e) 99.5 h; and (f) 167.5 h storage time at $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

molecules is very rapid and, in most cases, we are not able to chromatographically catch the exact moment at which the two antimers appear in the solution side by side as the racemic mixture. Far more often, the chromatogram shows either of the two antimers in a pure, or in a strongly predominant form. We also managed to demonstrate that the chromatographic process – and specifically, the spontaneous stirring of the migrating sample which passes through a labyrinth of randomly arranged microchannels – can significantly affect the transesterification and, in extreme cases, it can even result in nearly full racemization of the optically pure starting material, as was the case with *S*-(+)- and *R*-(-)-flurbiprofen.^[9]

Sometimes, however, a rare case can be captured when the two antimers derived from a single optically pure enantiomer appear chromatographically separated in comparable proportions.

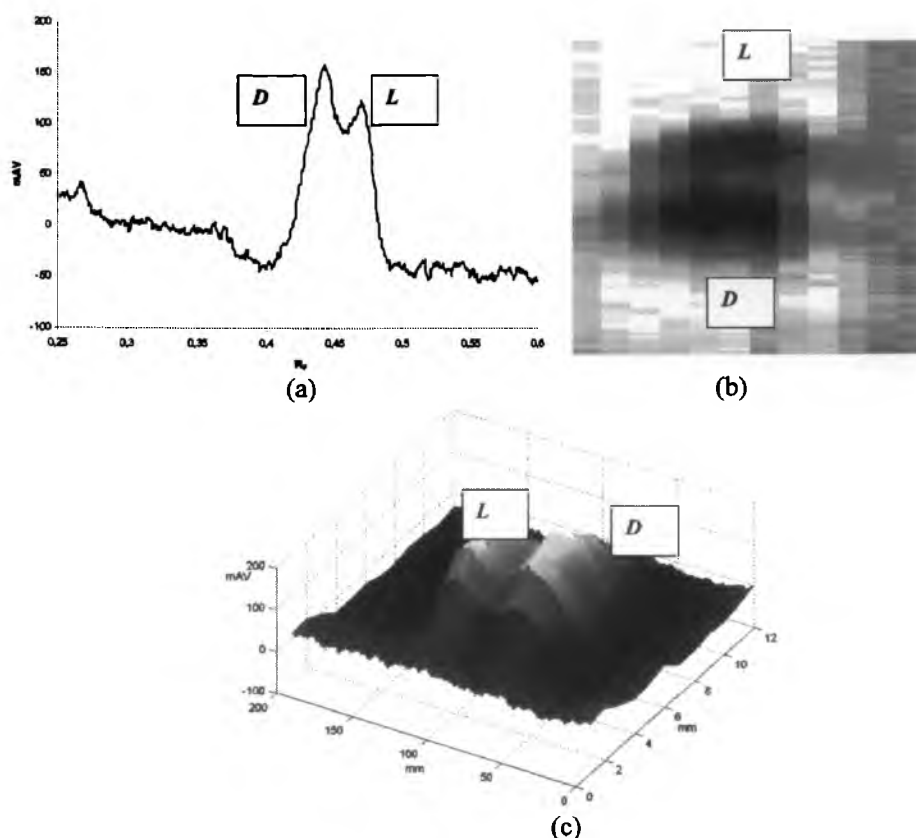


Figure 4. 1D (densitogram) (a), 2D (b) and 3D (c) representations of the two enantioseparated chromatographic spots of *L*- α - and *D*- α -phenylalanine after sample storage for 99.5 h in ethanol – water solution (7:3, v/v) at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. The 2D and 3D pictures were drawn on the densitometric scans of the separated pair of *L*, *D*- α -phenylalanine antimers taken at 1-mm intervals.

In Figs. 4(a)–(c), we give a typical example of an incomplete enantio- F4 separation of *L*- α -phenylalanine from its *D* antimer for a sample stored for a longer period of time (99.5 h) in the amphiprotic ethanol-water solution.

Photography

Chemical oscillatory processes often follow a kinetic-diffusive mechanism.^[7] The diffusive effect may arise from the density anisotropy of the reaction medium, which can be caused by several factors. Among these factors are: the gelating property of a constituent of the reaction medium; liquid-crystalline organization of the molecules of the reaction mixture; formation of an intermediate or product faster than its diffusion in the reaction medium, etc.

In the case of the oscillatory transesterification of profens, first described in papers,^[1-3] it is well documented that these compounds possess a gelating property and/or an ability to organize the low molecular weight molecules of the respective solvents in such a way as to result in the density anisotropy of the liquid reaction mixture. In a paper,^[8] we provided abundant experimental evidence (in the form of viscosimetric, high performance liquid chromatographic (HPLC), and ¹H NMR spectroscopic data) pointing to the lack of homogeneity of profen solutions.

Here, we document the density anisotropy of the colorless, transparent and, in daylight, apparently homogenous solution of *L*- α -phenylalanine in 70% aqueous ethanol in the most direct way, namely, by photographing this solution in UV light at 254 nm (Fig. 5). The lack of density homogeneity of this *L*- α -phenylalanine solution poured onto a watchglass is evident from the regular series of concentric stripes that make a jelly-like impression. This result strongly supports the notion that the oscillatory structural conversion of *L*- α -phenylalanine can follow a kinetic-diffusion mechanism.

F5

Polarimetry

The specific rotation of *L*- α -phenylalanine solutions in ethanol-water, ethanol-basic buffer, and ethanol-glacial acetic acid binary mixtures



Figure 5. Photograph of a 70% aqueous ethanol solution of *L*- α -phenylalanine on a watchglass, taken in UV light at 254 nm.

(with the *L* amino acid concentration always equal to 3.03×10^{-2} mol L⁻¹) was measured for 240 min by polarimetry at two different working temperatures, $9 \pm 2^\circ\text{C}$ and $22 \pm 2^\circ\text{C}$. At each temperature, one sample was kept unstirred and the other was stirred by ultrasonication, in order to also investigate the effect of stirring.

At both working temperatures, with and without stirring, the specific rotation of the *L*- α -phenylalanine solutions was not constant, but underwent oscillatory changes. The amplitude of these oscillations at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ was considerably lower than at $9 \pm 2^\circ\text{C}$. This effect can probably be ascribed to the lower viscosity of the samples kept at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and, hence, to the less pronounced density anisotropy of these solutions. The results obtained at $9 \pm 2^\circ\text{C}$ are shown in Figs. 6(a)–(c). F6

From the results in Figs. 6(a)–(c), the following conclusions can be drawn. First, the amplitude of oscillation in the stirred samples is, in most cases, lower than in the unstirred ones. We conclude that stirring the solutions tends to destroy their density anisotropy and, hence, to hamper the oscillatory transenantiomerization of *L*- α -phenylalanine. Secondly, the highest amplitude of oscillations is observed in the basic environment [Fig. 6(b)], somewhat lower in the amphiprotic one [Fig. 6(a)], and the lowest in the acidic environment [Fig. 6(c)]. These results coincide well with our earlier findings^[4] as to the catalytic influence of basic and amphiprotic environments on the oscillatory steric conversion of the chiral 2-arylpropionic acids via the keto-enol tautomerism. Finally, the polarimetric results combined with the TLC data provide strong evidence in favor of oscillatory transenantiomerization of *L*- α -phenylalanine dissolved in low molecular weight solvents and stored for long periods of time.

Modeling of the Oscillatory Transenantiomerization of *L*- α -Phenylalanine

Oscillatory chemical reactions are relatively rare, and elucidating the molecular mechanism of such processes is a considerable challenge. We have proposed a preliminary model of the oscillatory transenantiomerization of profens and of *L*- α -phenylalanine.^[10,11] Here, we introduce the model, applied to the oscillatory transenantiomerization of *L*- α -phenylalanine, in somewhat greater detail, considering spatial as well as temporal behavior.

The stoichiometry of the oscillatory transenantiomerization of *L*- α -phenylalanine is given by Eq. (2), although this equation does not reflect the elementary steps involved. Below, we present an outline of a plausible skeleton mechanism in the form of a set of elementary

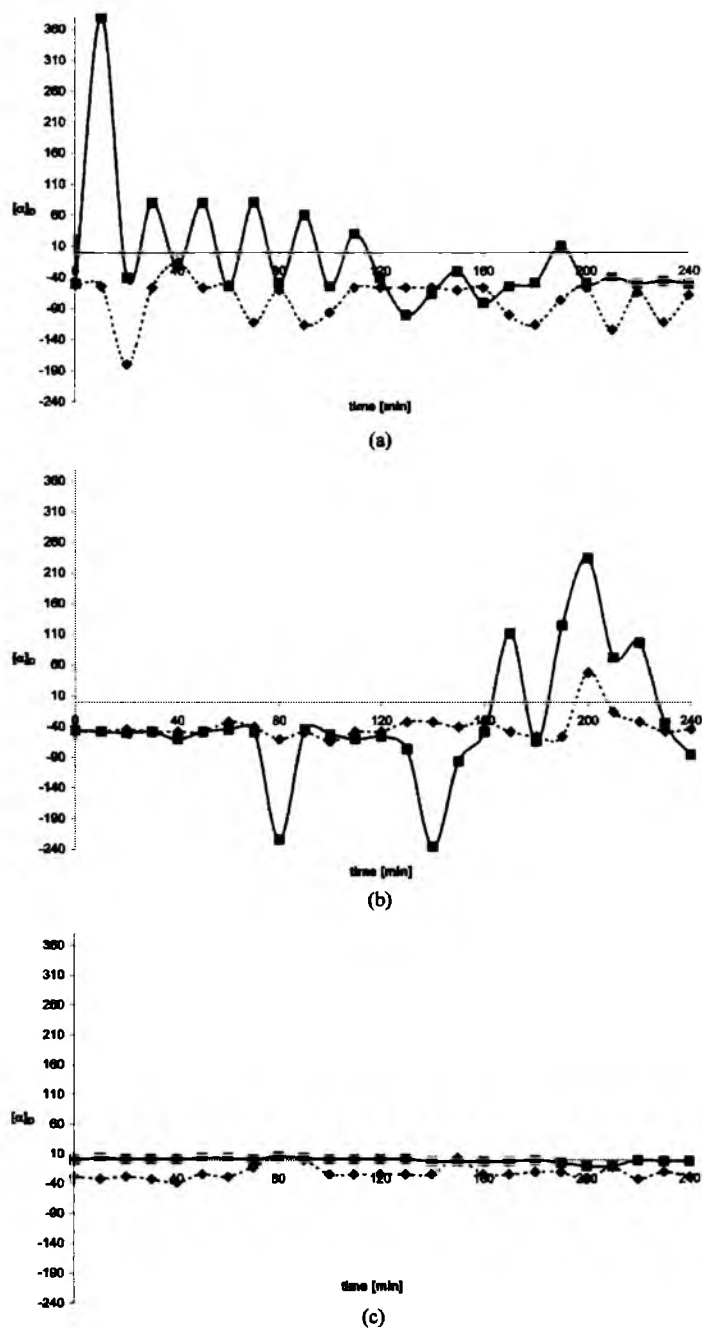
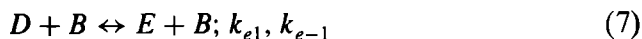
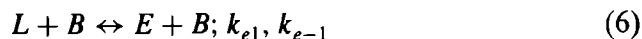


Figure 6. Comparison of the oscillations of the specific rotation value ($[\alpha]_D$) for *L*- α -phenylalanine dissolved and stored for 240 min at $9 \pm 2^\circ\text{C}$ in (a) ethanol + water (7:3, v/v), (b) ethanol + basic buffer, pH = 9 (7:3, v/v), and (c) ethanol + glacial acetic acid (7:3, v/v) with and without ultrasonication (solid line: without ultrasonication; dashed line: with ultrasonication).

chemical reactions that we posit to play a role in the amino acid transenantiomerization.

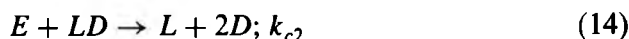
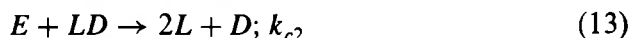
Enolization



Dimerization



Catalysis



where *L* and *D* are the *L*- and *D*-enantiomers, respectively, *E* is the keto-enol, *B* is base, *L*₂ and *D*₂ are the homodimers (held together by hydrogen bonds) of *L* and *D*, respectively, LD is the H-bonded heterodimer of *L* and *D*, the *k*'s are the respective reaction rates, and the *K*'s are the corresponding equilibrium constants.

Based upon the results of our experiments and the known properties of keto-enol tautomerism, we take the first step of our mechanism (i.e., *enolization*) to be the base-catalyzed formation of the keto-enol derived from either enantiomer *L* or enantiomer *D* (the reversible reactions given by Eqs. (6) and (7)).

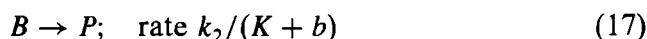
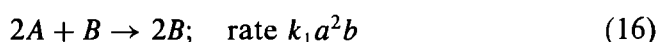
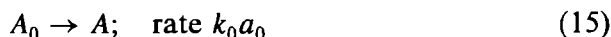
As 2-APAs are carboxylic acids, they interact through hydrogen bonds. When dissolved in low polarity solvents, they tend to form cyclic dimers, while in polar solvents, they can also form mixed associative multimers. The dimerization constitutes step two of the mechanism (parallel to step one), labeled as *dimerization* and described by the reversible Eqs. (8)–(10).

Step three – *catalysis* – is crucial for the interconversion of the chiral 2-APA, and it is described by the four irreversible Eqs. (11)–(14). Eqs. (11) and (12) express the critical assumption that each homodimer (*L*₂ or *D*₂, respectively) catalyzes generation of, i.e., acts as a template for, the corresponding enantiomer from the keto-enol (whose formation is, in turn, catalyzed by the base). In the case of the heterodimer LD,

we assume that it catalyzes formation of the enantiomers L and D with equal probability, in a non-stereospecific way (Eqs. (13) and (14)).

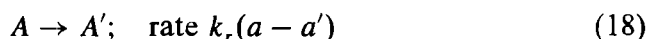
In order to properly analyze the kinetic equations corresponding to the stoichiometric Eqs. (6)–(14), one ought to know at least the orders of magnitude of each of the rate constants, which are, in fact, unavailable and extremely difficult, if not impossible, to measure. Rather than trying to fit all of the parameters of our mechanism quantitatively, we decided to focus on the qualitative behavior of the *catalysis* portion of our mechanism and to represent this aspect by an even simpler mechanism, the Templator.^[11,12]

The Templator model attempts to capture the essential elements of the dynamic behavior of self-replicating systems^[13] in three elementary steps:



where $a = [A]$, $b = [B]$, etc. The monomer A flows continuously into the system (15) and undergoes dimerization to form the dimer B , which acts as a template for its own formation (16). B is transformed via a catalytic reaction (17) to the inert product P .

Reactions (15)–(17) constitute a rather crude caricature of our system, but they contain the essential aspect of multimer-promoted transformation and, with only two species, A and B , whose concentrations need to be followed, they are simple enough to allow simulation and analysis of their dynamics, even when coupled to a second Templator. Let A and B represent the monomeric and dimeric forms, respectively, of the L -enantiomer. We introduce a second set of reactions, analogous to reactions (15)–(17) involving the corresponding D -species, which we designate as A' and B' . We also add the reversible interconversion of the monomeris species via keto-enol tautomerization:



The rate equations for our coupled system are:

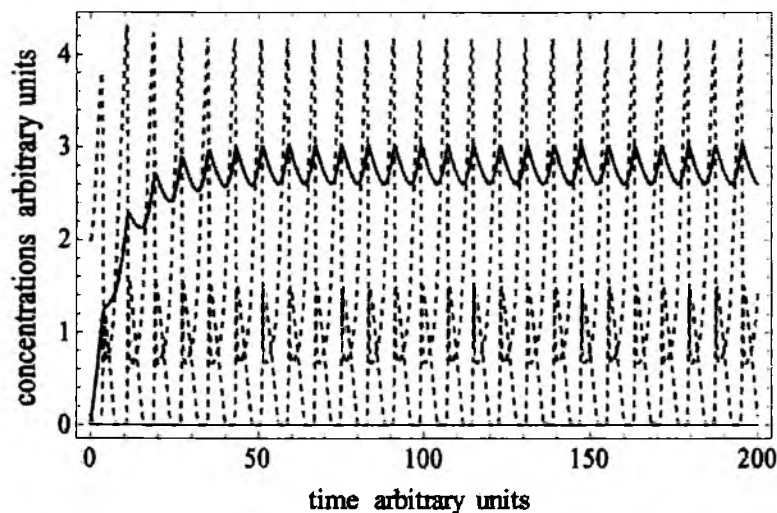
$$da/dt = k_0 a_0 - 2k_1 a^2 b + k_r (a' - a) \quad (19)$$

$$db/dt = k_1 a^2 b - \frac{k_2 b}{b + K} \quad (20)$$

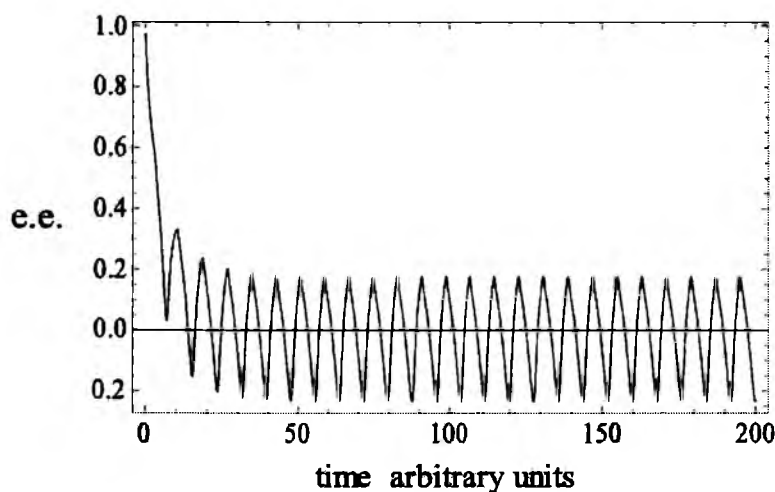
$$da'/dt = k_0 a'_0 - 2k_1 a'^2 b' - k_r (a' - a) \quad (21)$$

$$db'/dt = k_1 a'^2 b' - \frac{k_2 b'}{b' + K} \quad (22)$$

Since we are interested primarily in the qualitative behavior of our model, we chose the simple set of parameter values $k_0 a_0 = 1$, $k_1 = 1$, $k_2 = 1$, $k_e = 0.1$, $K = 0.1$ and investigated the behavior of the system at various values of $k_0 a'_0$. Note that, by rescaling the variables or, equivalently, choosing appropriate units for the time and concentrations, it is possible to assign any desired value to a particular parameter without changing the qualitative behavior of the system. We numerically



(a)



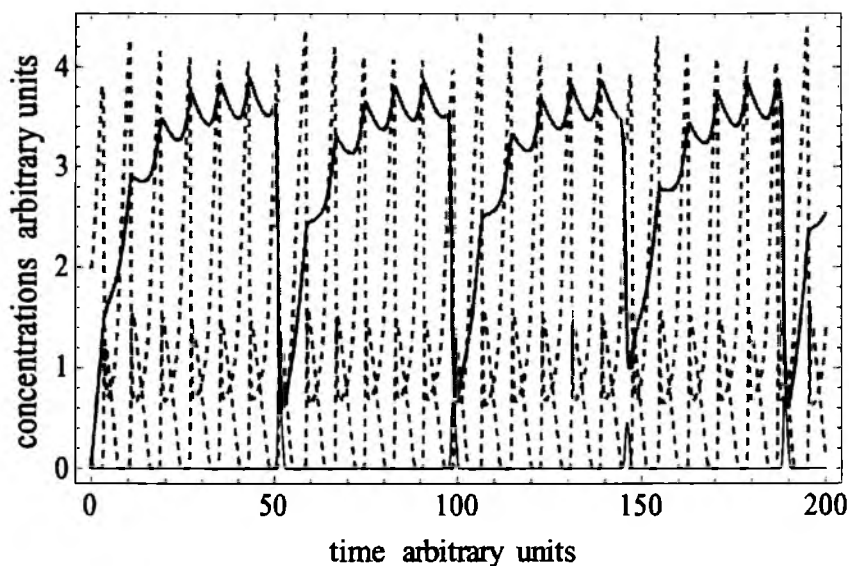
(b)

Figure 7. Simulations of model (19)–(22) with $k_0 a'_0 = (a, b) 0.1$, (c,d) 0.2. Initial conditions $a_0 = 2$, $b_0 = 0.1$, $a'_0 = 0.01$, $b'_0 = 0.01$. In (a) and (c) gray dashed line and gray solid line show a and b , respectively; black dashed line and black solid line show a' and b' , respectively.

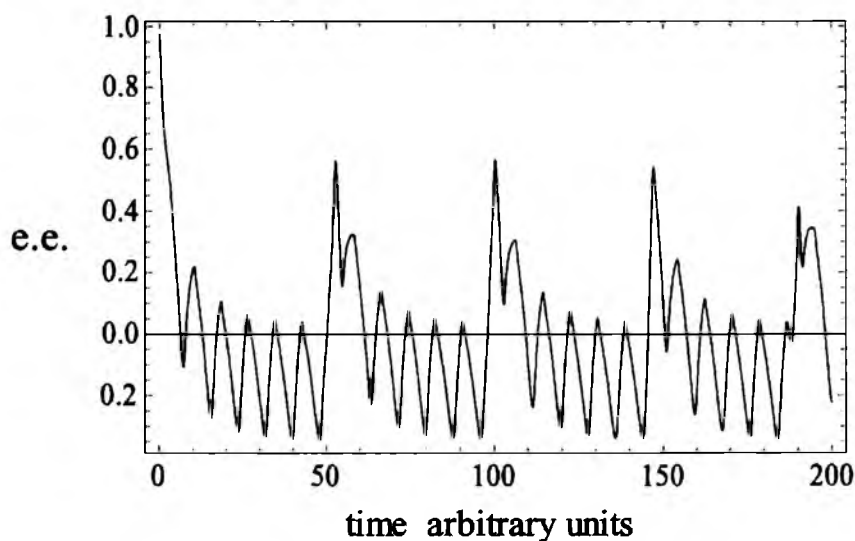
integrated Eqs. (19)–(21) using the Matlab software package and obtained oscillatory behavior over a wide range of parameters. We define the enantiomeric excess (e.e.) as

$$e.e. = (a + 2b - a' - 2b') / (a + 2b + a' + 2b') \quad (23)$$

i.e., as the difference between total *L*-monomer and total *D*-monomer concentrations divided by the total monomer concentration.



(c)



(d)

Figure 7. Continued

In Figure 7, we show the results obtained for two values of $k_0 a'_0$. In effect, the ratio a'_0/a_0 gives the fraction of impurity in the nominally optically pure starting material. In both cases, the behavior becomes periodic after a brief initial transient, and the sign of e.e. oscillates from positive to negative. For the higher level of impurity, the behavior is quite complex, with several maxima and minima per cycle, consistent with some of the irregular behavior seen in studies of the profens.^[1-3] For other choices of the kinetic parameters, the system either behaves monotonically or oscillates in such a fashion that e.e. never changes sign.

We also explored whether our coupled Templator model can give rise to spatial patterning. To do this, we added diffusion terms to Eqs. (19)–(22) for a one-dimensional (line) system of length 10. We took the diffusion coefficients of *A* and *A'* to be equal and the diffusion coefficients of the dimeric species to be significantly smaller than those of the monomers, which is necessary, though not sufficient, for Turing pattern formation.^[14] Starting from the parameters and homogeneous initial conditions corresponding to Fig. 7(c) and 7(d), we added a small random perturbation to the concentration of *A* and followed its evolution in time and space. The results are shown as space-time plots in Fig. 8. Looking parallel to the horizontal axis of Figs. 8(a) and 8(b), we observe a well-defined spatial structure for the *L*-form, with regions of high *a* and low *b* alternating with regions of low *a* and high *b*. Along the vertical axis, we observe a temporal periodicity as well. Interestingly, *a'* and *b'* [Figs. 8(c) and (d)] are almost homogeneously distributed in space, though they oscillate periodically in time. The e.e. plot in Fig. 8(e) reflects, primarily, the structure of the *B* concentration profile.

Summing up, our explanation of the oscillatory *in vitro* chiral inversion of *L*- α -phenylalanine is grounded in the molecular structure of the compound, in particular its ability to intermolecularly interact through hydrogen bonds to form supramolecular structures of H-bonded cyclic dimers and/or H-bonded linear multimers. These structural features are essential for the enantioselective templating process that lies at the heart of our mechanism.

Qualitative agreement between our experimental results and theoretical simulations can best be seen from a comparison of the oscillatory nature of the plots shown in Figs. 2 and 6 (experiment) with those given in Fig. 7 (theory). The oscillatory plots from Figs. 2, 6, and 7 illustrate, respectively, the time behavior of the experimental retention parameter (R_F), the polarimetrically measured specific rotation ($[\alpha]_D$), and the simulated concentration changes of the two antimers (*a*, *a'*, *b*, *b'*). Qualitative agreement is also found between the stripes in the photograph in Fig. 5 (experiment) and the simulated patterns in Fig. 8 (theory), though the latter only demonstrates spatial concentration anisotropy of the two antimers in one spatial dimension.

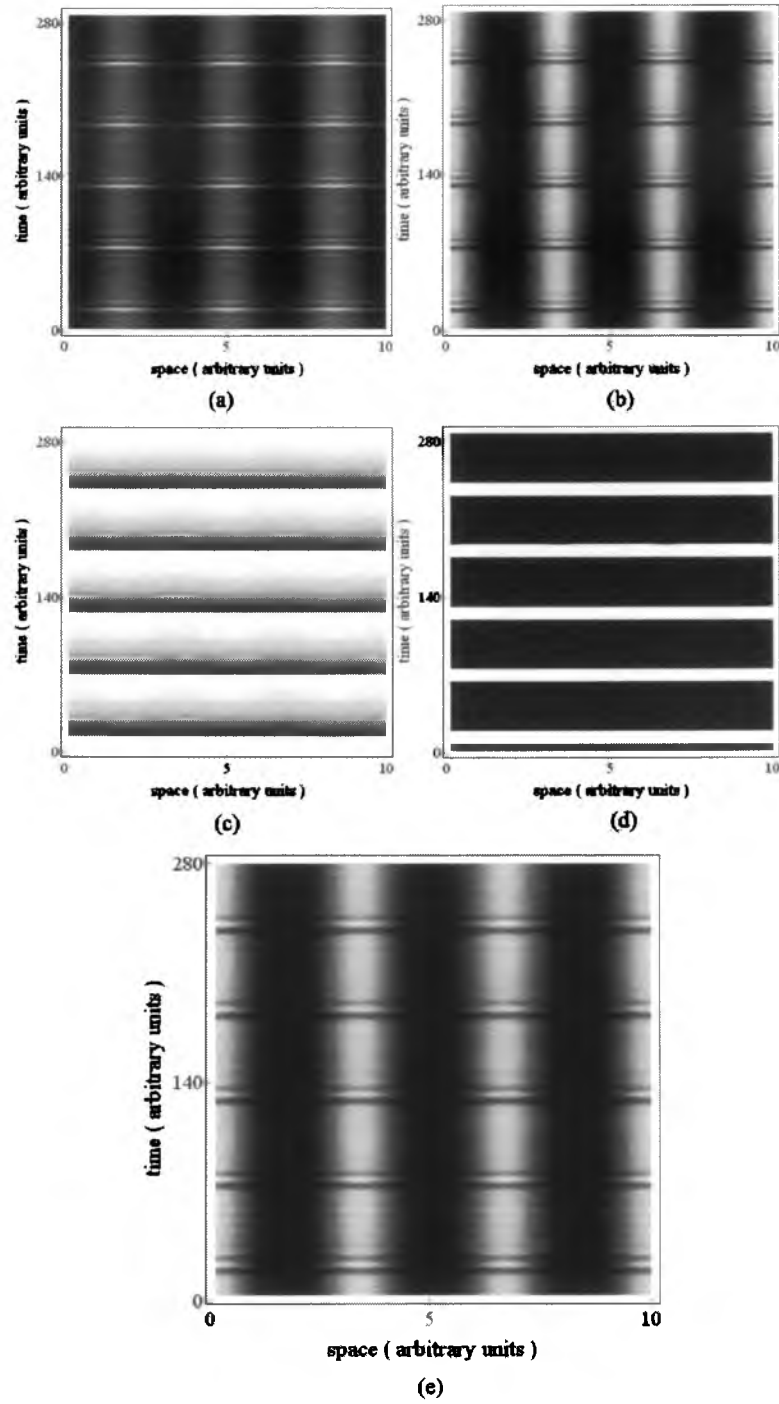


Figure 8. Space-time plot of simulated concentrations with model (19)–(22) augmented with diffusion of all species. Diffusion coefficients $D_A = D'_A = 1$, $D_B = D_{B'} = 0.125$. Initial conditions and parameters as in Fig. 7c,d. White corresponds to high concentrations, black to low concentrations. (a) a , (b) b , (c) a' , (d) b' , (e) $e.e$.

Our model explanation of the oscillatory *in vitro* chiral inversion of *L*- α -phenylalanine is quite general and not restricted to this compound alone. It is not limited to amino acids with a chemical structure that can formally be derived from propionic acid. It can be applied to profen drugs as well, though the limits of its applicability have not yet been explored in detail. One may also be able to apply this model to chiral carboxylic acids formally derived from butyric acid, or from even higher aliphatic acids (i.e., to such amino acids as valine, leucine, and threonine, and to such drugs as bufens). On the other hand, with increasing aliphatic chain length, the ability of carboxylic acids to form intermolecular hydrogen bonds will gradually diminish (due to the shielding effect of the flexible aliphatic chain) and, accordingly, their ability to undergo the oscillatory *in vitro* chiral inversion should also decrease. Of course, the generality of our model also implies that, in the absence of detailed data on the kinetic parameters for a particular chiral species, we can only derive qualitative rather than quantitative conclusions from our simulations.

In future studies, we will focus on the search for new chiral compounds and compound classes that show an analogous ability to undergo oscillatory chiral inversion and on studying the relationship between their molecular structure and the kinetics of their oscillations. Our experience suggests that thin-layer chromatography is a particularly promising tool for this kind of investigation, and we will continue to employ this technique in our investigations.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Merck KGaA (Darmstadt, Germany) for supplying the TLC plates used in our experiments. This work was supported in part by the U.S. National Science Foundation (grant CHE-0615507).

REFERENCES

1. Sajewicz, M.; Piętko, R.; Pieniak, A.; Kowalska, T. Application of thin-layer chromatography (TLC) to investigating oscillatory instability of the selected profen enantiomers. *Acta Chromatogr.* **2005**, *15*, 131–149.
2. Sajewicz, M.; Piętko, R.; Pieniak, A.; Kowalska, T. Application of thin-layer chromatography (TLC) to investigate oscillatory instability of the selected profen enantiomers in dichloromethane. *J. Chromatogr. Sci.* **2005**, *43*, 542–548.
3. Sajewicz, M.; Piętko, R.; Pieniak, A.; Kowalska, T. Application of thin-layer chromatography to the investigation of oscillatory instability of selected profen enantiomers in physiological salt. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **2006**, *29*, 2059–2069.

4. Sajewicz, M.; Piętko, R.; Drabik, G.; Kowalska, T. On the mechanism of oscillatory changes of the retardation factor (R_F) and the specific rotation $[\alpha]_D$ with selected solutions of *S*-(+)-naproxen. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **2006**, *29*, 2071–2082.
5. Virtual catalog of ScienceLab.com (<http://sciencelab.com/>)
6. Bhushan, R.; Reddy, G.P.; Joshi, S. TLC resolution of DL amino acids on impregnated silica gel plates. *J. Planar Chromatogr.* **1994**, *7*, 126–128.
7. Gray, P.; Scott, S.K. *Chemical Oscillations and Instabilities. Non-Linear Chemical Kinetics*. Clarendon Press, Oxford, 1994.
8. Sajewicz, M.; Piętko, R.; Kuś, P.; Kowalska, T. On the gelation of profens as a property causing their oscillatory transenantiomerization. *Acta Chromatogr.* **2006**, *16*, 181–191.
9. Sajewicz, M.; Gontarska, M.; Kronenbach, D.; Wojtal, Ł.; Grygierczyk, G.; Kowalska, T. A study on the oscillatory in vitro transenantiomerization and enantioseparation of the flurbiprofen antimers by means of thin layer chromatography (TLC). *Acta Chromatogr.* **2007**, *18*, 227–238.
10. Sajewicz, M.; Epstein, I.R.; Kowalska, T. Proceedings of the 7th Balaton Symposium on High Performance Separation Methods (In Memoriam Szabolcs Nyiredy), Sept. 5th–7th, Siófok, Hungary, 2007.
11. Sajewicz, M.; Gontarska, M.; Wojtal, Ł.; Epstein, I.R.; Kowalska, T.T. Proceedings of the 7th Balaton Symposium on High Performance Separation Methods (In Memoriam Szabolcs Nyiredy), Sept. 5th–7th, Siófok, Hungary, 2007.
12. Peacock-Lopez, E.; Radov, D.B.; Flesner, C.S. Mixed-mode oscillations in a self-replicating dimerization mechanism. *Biophys. Chem.* **1997**, *65*, 171–178.
13. Tsai, L.L.; Hutchinson, G.R.; Peacock-Lopez, E. Turing patterns in a self-replicating mechanism with a self-complementary template. *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 2003–2006.
14. Tjivikua, T.; Ballester, P.; Rebek, J. A self-replicating system. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1249–1250.
15. Turing, A.M. The chemical basis of morphogenesis. *Phil. Trans. Roy. Soc. London*, **1952**, *B237*, 37–72.

AQ2

Received November 28, 2007

Accepted December 14, 2007

Manuscript 6311B

TLC Study of the Separation of the Enantiomers of Lactic Acid

M. SAJEWICZ, E. JOHN, D. KRONENBACH, M. GONTARSKA,
AND T. KOWALSKA

Institute of Chemistry, Silesian University,
9, Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland
E-mail: kowalska@us.edu.pl

Summary. Enantiomer separation by TLC is still much less frequent than with other, mostly instrumental, chromatographic techniques. From a literature survey it is apparent that separation of the enantiomers of D,L-lactic acid is primarily of interest to the dairy industry and that this particular separation is less frequently performed by chromatographic than by membrane techniques. As far as we are aware, before our studies only one report of TLC separation of the enantiomers of D,L-lactic acid was available in the literature; this is dated 1991 and describes the use of non-instrumental TLC only. In this study, we started by reproducing the TLC procedure originating from 1991, for this purpose using TLC with automatic sample application and densitometric detection. We managed to repeat the earlier procedure and to achieve full, i.e. baseline, separation of the enantiomers, with a remarkable distance between the two antimers. However, we revealed a significant drawback of this separation procedure – D-(–)-lactic acid was transported almost with the mobile-phase front and its densitometric quantification was barely possible because of the relatively high UV absorption of the mobile-phase front line. The reference method for separation of the enantiomers of D,L-lactic acid consisted in preliminary impregnation of commercial silica gel TLC plates with copper(II) acetate. In-situ formation of bidentate complexes of the D,L-lactic acid antimers with the Cu^{2+} cation resulted in different mobilities of these complex cations in the planar chromatographic system. The objectives of this study were twofold – to investigate separation of the enantiomers of D,L-lactic acid with other transition metal cations (i.e., Co^{2+} , Ni^{2+} , and Mn^{2+}) used to impregnate the silica gel (to achieve resolution that might enable quantification of the two lactic acid antimers and not only the L-(+) enantiomer) and to gain deeper insight into the mechanism of separation with these metal cations. For purposes of comparison, we chromatographed D,L-lactic acid on non-impregnated silica gel layers. As a result, we managed to establish efficient separation conditions with the Ni^{2+} and Co^{2+} cations that outperformed the earlier established procedure involving the Cu^{2+} cation, and – partially at least – to elucidate the mechanism of separation of the enantiomers of D,L-lactic acid by these TLC systems. The Mn^{2+} cation proved unsuitable for the purpose. Finally, we managed to separate the enantiomers of D,L-lactic acid on non-

impregnated silica gel layer also, which seems yet more proof of the microcrystalline chirality of silica gel used as stationary phase and of its substantial contribution to the enantiomer separation investigated.

Key Words: TLC enantioseparation, lactic acid antimers, transition metal complexes, silica gel chirality

Introduction

Chromatographic analysis (enantiomer separations included) of lactic acid is a challenging task, because the compound lacks chromophoric groups that might absorb UV light in the so-called 'normal' UV range. However, our research in recent years has focused on the TLC separation of the enantiomers of α -propionic acid derivatives, lactic acid included [1–5].

In our previous paper devoted to separation of the enantiomers of lactic acid by TLC [5], we utilized a procedure described elsewhere [6] which consisted in preliminary impregnation of commercial silica gel TLC plates with copper(II) acetate, in situ formation of bidentate complexes with the Cu^{2+} cation, and exploitation of the different mobilities of these complex cations in the planar chromatographic system. The procedure proved perfectly reproducible in our laboratory and enabled excellent baseline resolution of the two lactic acid antimers. There was, at the same time, a substantial drawback – D-(–)-lactic acid was transported almost with the mobile-phase front and its densitometric quantification was barely possible, because of the relatively high UV absorption of the mobile-phase front line itself.

The objectives of this study were twofold:

- (i) to investigate separation of the enantiomers of D,L-lactic acid with other transition metal cations (i.e., Co^{2+} , Ni^{2+} and Mn^{2+}) as silica gel impregnants (to achieve resolutions that might enable densitometric quantification of the two lactic acid antimers and not only the L-(+) enantiomer); and
- (ii) to gain deeper insight in the mechanism of separation by use of the Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , and Mn^{2+} cations.

For purposes of comparison, we also chromatographed D,L-lactic acid on non-impregnated silica gel layers as a special sort of 'blank'.

Experimental

Reagents

In this study, we used L-(+)-lactic acid manufactured by Fluka (Buchs, Switzerland; #69771). The Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , and Mn^{2+} salts used for the impregnation of the silica gel layers were exclusively acetates of analytical-grade purity (POCH, Gliwice, Poland).

In the experiments, we used the solutions of L-(+)-lactic acid dissolved in 7:3 (*v/v*) ethanol-water and stored for over one month before chromatographic separation of the enantiomers. During this the L-(+)-lactic acid solutions underwent almost complete racemization [5]. Initial concentrations of L-(+)-lactic acid in the spotted samples were 50 g L^{-1} ($5.55 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$) and 20 g L^{-1} ($2.22 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$).

Thin-Layer Chromatography (TLC)

Development of the chromatograms was performed on $20 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$ commercial glass plates precoated with 0.25-mm layers of silica gel (Merck, Darmstadt, Germany; #1.05715). Before proper development the plates were pre-developed with 9:1 (*v/v*) methanol-water to wash any possible contaminants from the plate surface. They were then dried at ambient air ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) for 3 h. The pre-developed and dried plates were then impregnated by dipping them for 10 min in aqueous solutions of copper(II) acetate, cobalt(II) acetate, nickel(II) acetate, and manganese(II) acetate (the concentration of each impregnating solution was $5.01 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). Finally, the impregnated plates were divided in two batches and the first batch was dried for 1 h in ambient air whereas the second batch was activated for 30 min in a drying chamber at 110°C . Activation of the second batch of chromatographic plates before development of the chromatograms was to eliminate water ligands from the aqua complexes of the Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , and Mn^{2+} cations, to facilitate complexation with lactic acid.

One-dimensional TLC separation of the enantiomers of racemic lactic acid was performed at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ with dioxane-water [9:1 (*v/v*) when Cu^{2+} and Mn^{2+} were used and 8:2 (*v/v*) when Co^{2+} and Ni^{2+} were used] as mobile phase. Application of the analyte samples on to the metal acetate-impregnated plates was performed with an AS 30 autosampler (Desaga, Heidelberg, Germany). Nine 5- μL samples (with Cu^{2+} , Ni^{2+} , and Mn^{2+}) or nine 3- μL samples (with Co^{2+}) of the D,L-lactic acid solution (concentration 50 g L^{-1}) were applied 2 cm apart, 1.0 cm above the lower edge of the plate. In accordance with the previous work [6], all chromatograms were devel-

oped for 40 min (development distance approx. 8.5 cm) then dried at ambient temperature for 3 h. Finally, each chromatographic spot was densitometrically scanned in the direction of the development. Each individual experiment was repeated three times.

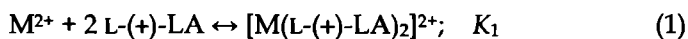
The racemic mixture of lactic acid (3 μL , its concentration equal to 20 g L^{-1}) was also chromatographed on activated and non-activated silica gel layers, pre-developed with 9:1 (*v/v*) methanol-water yet not impregnated with a salt of any transition metal cation, using 8:2 (*v/v*) dioxane-water as mobile phase. Use of the non-impregnated silica gel layers was considered in our study as a specific 'blank'.

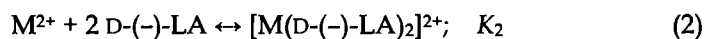
Densitograms were acquired with a Desaga Model CD 60 densitometer equipped with Windows-compatible ProQuant software. Concentration profiles of the development lanes were recorded in ultraviolet (UV) light from the deuterium lamp (in reflectance mode). The wavelength with each impregnating cation was experimentally chosen to provide the highest absorptivity of the metal cation-lactic acid complex. For the Cu^{2+} and Mn^{2+} cations, scanning of the chromatograms was performed at 240 nm, for the Co^{2+} cation at 230 nm, and for the Ni^{2+} cation at 260 nm. Densitometric scanning of non-impregnated chromatographic plates was performed at 200 nm. The dimensions of the scanning rectangular light beam were 0.02 mm \times 0.4 mm. Maxima of the respective concentration profiles were used for calculation of the retardation coefficient (R_F) values.

The chromatograms were also scanned in visible light and at the UV wavelength 254 nm by use of a Chromimage flatbed scanner (AR2i; Le Plessis Robinson, France), to save the pictures of the whole chromatograms. All chromatograms were also visualized by spraying the plates with the 95% sulphuric acid solution in 5% aqueous ethanol, followed by heating in a drying chamber at 110°C for 10 min [7]. It was also the objective of this experiment to confirm the presence of the two separated lactic acid antimers in the chromatograms by their *in situ* carbonization.

Results and Discussion

We initially assumed that the thermodynamically most justified mechanism of the investigated enantiomer separations was because of the competitive bidentate complexation of the bivalent transition metal cation (M^{2+}) with the two lactic acid molecules (either L-(+)-LA, or D-(-)-LA), to give the two below given homochiral complexes which differed in their respective stability constants, K_1 and K_2 ($K_1 \neq K_2$):





We also expected this complexation was occurring in situ at the starting spot of the chromatographic plate. Furthermore, we understood that – irrespective of the most probable complexation mechanism given by eqs (1) and (2), and resulting in formation of the homochiral $[M(\text{LA})_2]^{2+}$ cations, one cannot exclude minor contributions to the overall separation from transition metal-lactic acid complexes with a different number of ligands (e.g. $[M(\text{LA})]^{2+}$ and $[M(\text{LA})_3]^{2+}$).

It is, however, well known that the two enantiomers of a racemic compound have the same chemical properties [8]. Thus is it not a surprise that the numerical values of the stability constants for complex ions measured in bulk solutions are equal, irrespective of the steric configuration of chiral ligands (which is confirmed by results from coordination chemistry). Therefore differentiation between the chromatographic mobility of the two lactic acid antimers was believed to be because of a different steric arrangement of the $[M(\text{L-(+)-LA})_2]^{2+}$ and $[M(\text{D-(-)-LA})_2]^{2+}$ complexes on the solid-liquid interface of the chromatographic system.

The results obtained in this study resulted in somewhat deeper insight into the mechanism of separation of the enantiomers of lactic acid by TLC on the silica gel layers impregnated with selected transition metal cations. To our surprise, separation of the enantiomers of D,L-lactic acid was also possible on non-impregnated silica gel layers.

Enantiomer Separation on Layers Previously Activated for 30 min at 110°C

Chromatograms showing separation of the enantiomers of D,L-lactic acid on activated silica gel plates impregnated with the Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , or Mn^{2+} cations and on activated but non-impregnated (i.e. unmodified) silica gel plates are shown in Fig. 1. Average numerical values of R_F for L-(+)- and D-(-)-lactic acid on impregnated activated silica gel layers (and, for comparison purposes, on activated non-impregnated layers) are depicted graphically in Fig. 2.

Here it should be mentioned that elsewhere [5] we have reported in detail the spontaneous oscillatory in vitro chiral conversion of lactic acid, which is time-dependent and results in substantial instability of R_F values of the L-(+) and D-(-) lactic acid antimers. For this reason the numerical values presented in Fig. 2 are approximate only (and calculated as average values from five different chromatograms).

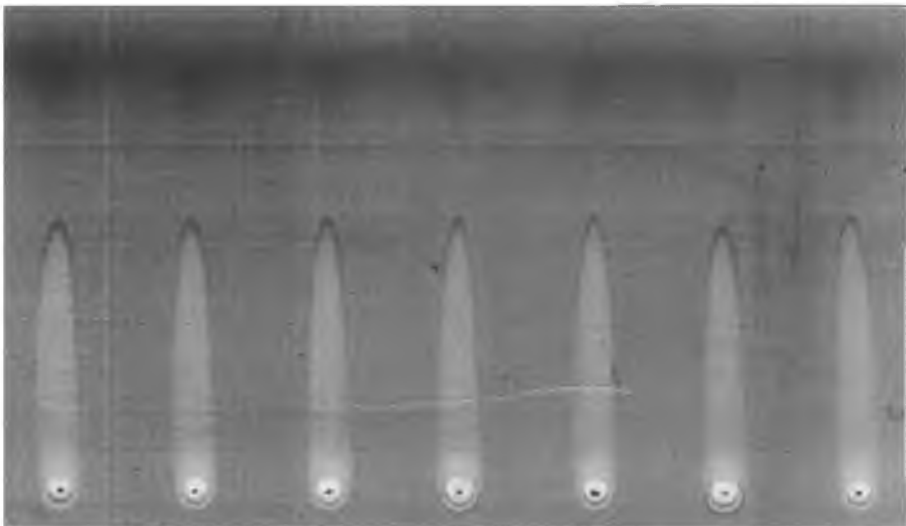


Fig. 1a.

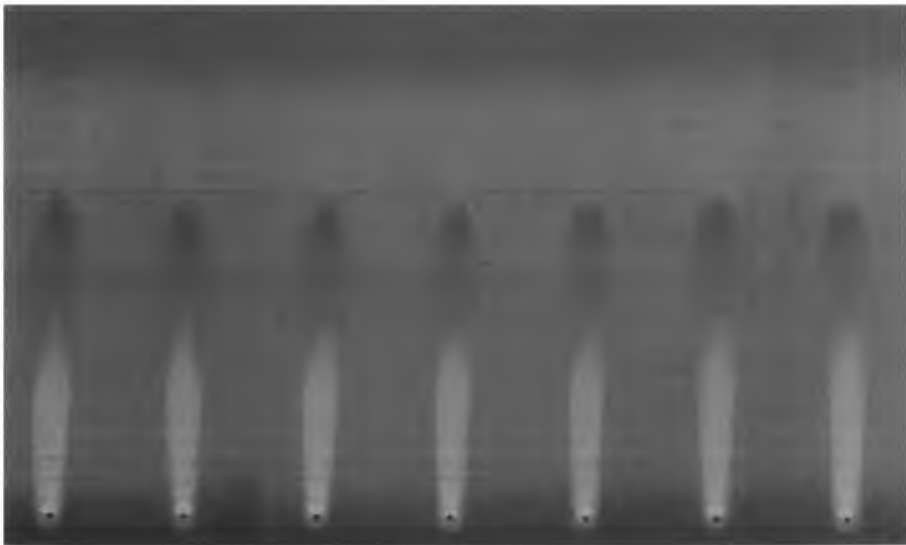


Fig. 1b.



Fig. 1c.



Fig. 1d.



Fig. 1e.

Fig. 1. Chromatograms showing separation of the enantiomers of D,L-lactic acid on activated silica gel plates impregnated with (a) Cu^{2+} , (b) Co^{2+} , (c) Ni^{2+} , and (d) Mn^{2+} cations; and (e) without impregnation. [(a) and (b) were scanned in visible light and (c)–(e) at 254 nm]

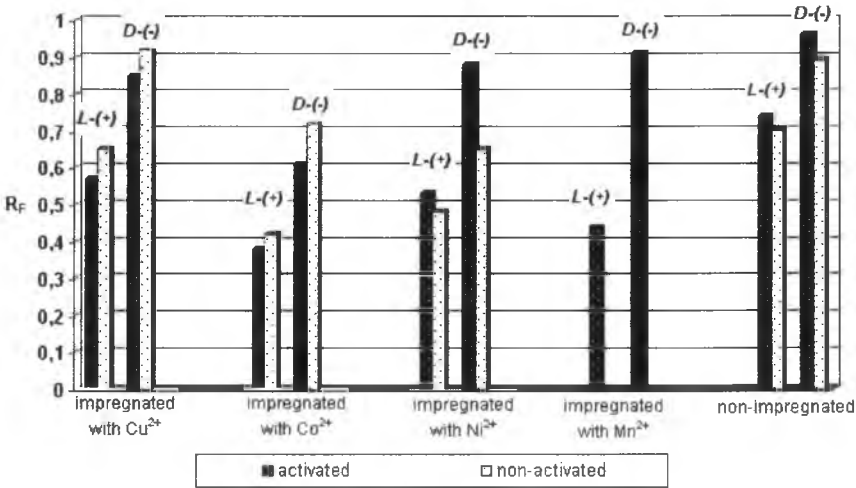


Fig. 2. Comparison of R_F values on activated (■) and non-activated (□) silica gel layers impregnated with Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , and Mn^{2+} cations, and on non-impregnated layers

The chromatograms shown in Fig. 1 resemble that presented by Cecchi and Malaspina [6]. Each development lane (except for Fig. 1e) clearly shows

decolouration of the silica gel layer under the lower chromatographic spot of the separated L-(+)-lactic acid, which seems to prove that the investigated metal cations undergo complexation with the lactic acid and move as complex cations up the plate. As confirmed by results presented by Cecchi and Malaspina [6], the D-(-) antimer always migrates higher than its L-(-) counterpart, which suggests that in this TLC system complexation of metal cations with D-(-)-lactic acid is less efficient than with its L-(+) counterpart.

Separation of the enantiomers of D,L-lactic acid on silica gel impregnated with the Mn^{2+} cation is shown in Fig. 3. As is apparent from this densitogram, resolution of the L-(+) and the D-(-) antimers is very good, but the concentration profile of D-(-)-lactic acid partially overlaps that of contaminants near the mobile-phase front line of the chromatogram. Consequently, quantification of the D-(-) enantiomer is virtually impossible with this chromatographic system, which does not, therefore, differ substantially from the original system [6] which used Cu^{2+} as impregnant. The other cations (Ni^{2+} and Co^{2+}) performed better on the non-activated layers and for this reason the respective densitograms will be discussed in the next section.

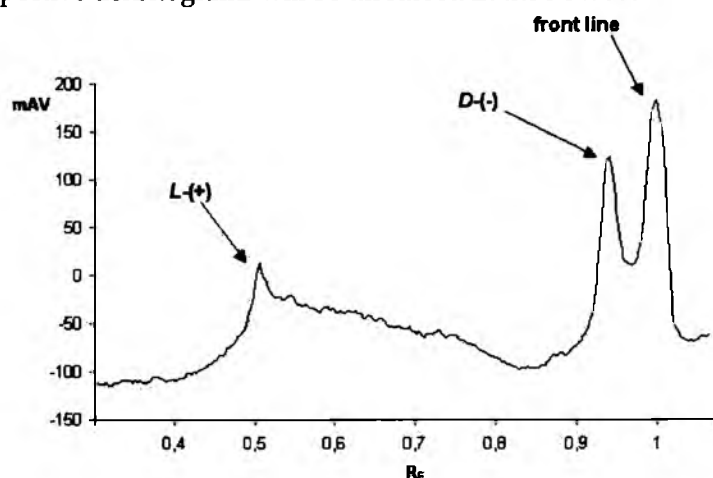


Fig. 3. 2D densitogram recorded from the activated silica gel layer impregnated with Mn^{2+} cations, which shows the highly diffused concentration profile of L-(+)-lactic acid and partial overlapping of the D-(-)-lactic acid concentration profile with contaminants at the mobile-phase front line of the chromatogram

The baseline enantioseparation of D,L-lactic acid on the non-impregnated silica gel layer could be regarded as rather astonishing in view of the well established fact that this kind of direct separation is only possible with chiral chromatographic systems. In earlier studies, however, we proved by use of circular dichroic spectroscopy that silica gel used in TLC has micro-

crystalline chirality which significantly contributes to separation of the enantiomers of racemic and scalemic mixtures [9–11]. Thus, in our view, a seemingly unexpected yet successful enantioseparation of D,L-lactic acid on non-impregnated silica gel layers is because of this microcrystalline chirality.

Enantiomer Separation on Layers Previously Dried for 1 h in Ambient Air

Chromatograms of the enantiomers of D,L-lactic acid separated on non-activated silica gel plates impregnated with Cu^{2+} , Co^{2+} , or Ni^{2+} cations (and also on the non-activated and non-impregnated plates) basically resemble those shown in Fig. 1 and therefore there is no need to present them. Because chromatographic results obtained after impregnation with the Mn^{2+} cation proved entirely irreproducible and significantly differed from one experiment to another, this system proved exceptional and was totally irrelevant analytically.

The densitogram of the enantiomers of D,L-lactic acid separated on a non-activated silica gel layer impregnated with the Cu^{2+} cations is shown in Fig. 4. This is a repetition of the separation reported by Cecchi and Malaspina [6], although the separation is more evident. From this densitogram it is evident that overlap of D-(–)-lactic acid with the contaminants accumulated along the mobile-phase front of the chromatogram makes quantification of this particular enantiomer almost impossible. There is, however, no doubt the D-(–) enantiomer of lactic acid is close to the mobile-phase front, as can easily be demonstrated by scanning the development track at 1-mm intervals and then drawing the 3D densitogram. The analogous separation of the enantiomers of D,L-lactic acid on unmodified non-activated silica gel is shown in Fig. 5, and the respective 3D densitogram is shown in Fig. 6.

An impossibility of quantifying D-(–)-lactic acid by the procedure proposed by Cecchi and Malaspina [6] gave rise to our current study. As a result, we managed to establish two alternative and well performing procedures for separation of the enantiomers of D,L-lactic acid (involving the Co^{2+} and Ni^{2+} cations) on activated and non-activated silica gel layers, although the more successful results were obtained on non-activated chromatographic plates. In each case, we obtained two well shaped and sufficiently well separated peaks of the lactic acid antimers, overlapping neither with the mobile-phase front of the chromatogram nor with each other. The respective densitograms are shown in Figs 7 and 8.

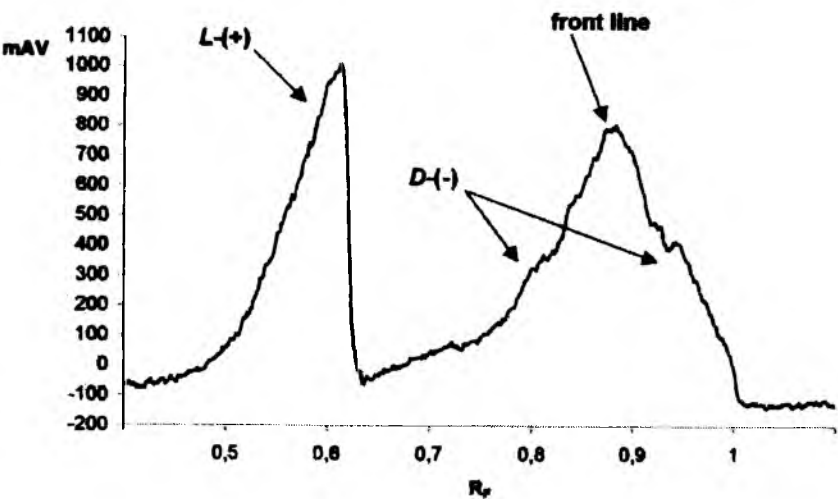


Fig. 4. Densitogram recorded from non-activated silica gel layer impregnated with Cu²⁺ cations, showing overlapping of the D-(-)-lactic acid concentration profile with contaminants accumulated along the mobile-phase front of the chromatogram

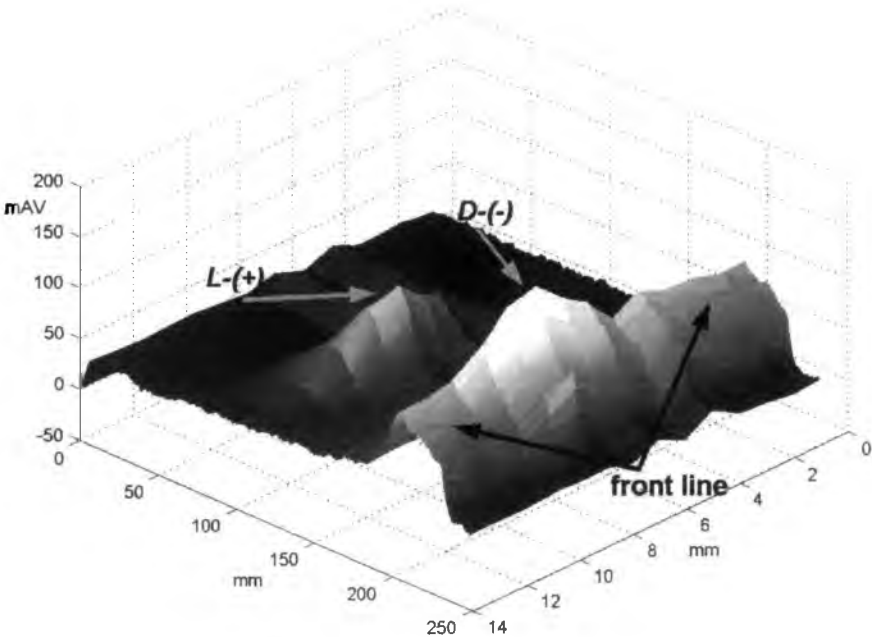


Fig. 5. 3D densitogram recorded from non-impregnated (i.e. unmodified) and non-activated silica gel layer, showing the presence of D-(-)-lactic acid in close proximity to the mobile-phase front of the chromatogram

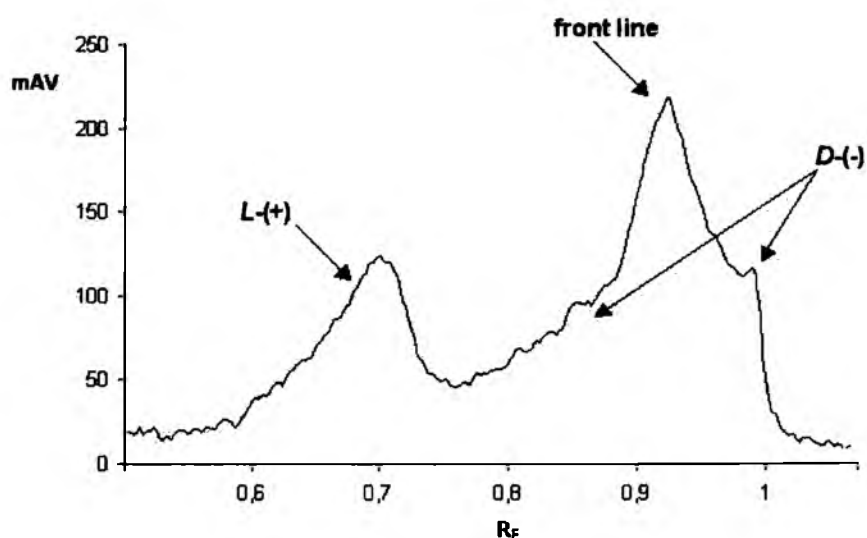


Fig. 6. 2D densitogram recorded from non-impregnated (i.e. unmodified) and non-activated silica gel layer, showing overlapping of the D-(-)-lactic acid concentration profile with the contaminants accumulated along the mobile-phase front of the chromatogram

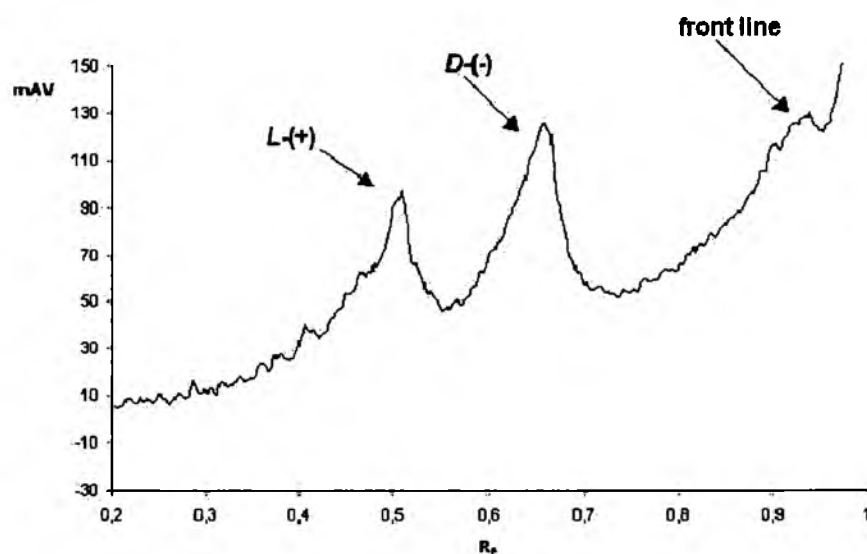


Fig. 7. 2D densitogram recorded from non-activated silica gel layer impregnated with Ni²⁺ cations, which shows good resolution of L-(+)- and D-(-)-lactic acid, and no overlapping with the contaminants accumulated along the mobile-phase front of the chromatogram

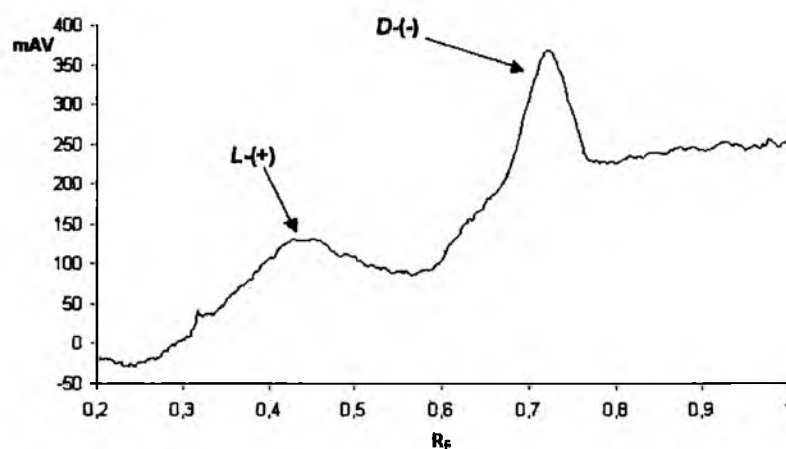


Fig. 8. 2D densitogram recorded from non-activated silica gel layer impregnated with Co^{2+} cations, which shows good resolution of L-(+)- and D-(-)-lactic acid, and no overlapping with the contaminants accumulated along the mobile-phase front of the chromatogram

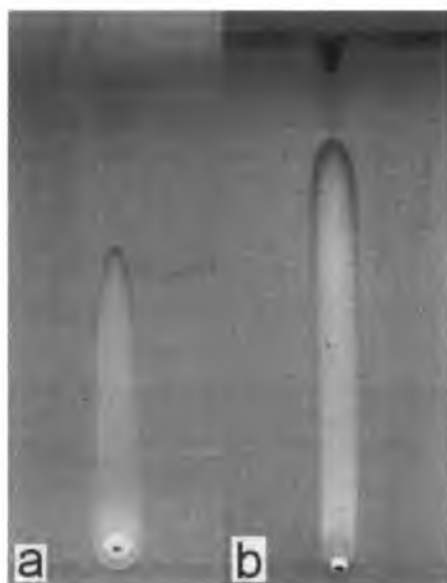


Fig. 9. Comparison of two development lanes showing separation of the enantiomers of D,L-lactic acid on (a) activated and (b) non-activated silica gel plates impregnated with Cu^{2+} cations

If we compare the development lanes obtained on activated and the non-activated silica gel layers impregnated with a given metal cation, we

notice that the decoloured area on the adsorbent surface along the development lanes is larger for the non-activated chromatographic plates than for the activated plates (see, for example, Fig. 9). This is most probably because, in the course of activation, "physical" water is desorbed from the silanol groups on the silica gel surface, and the "chemical" water molecules acting as ligands are eliminated from the aqua complexes of the transition metal cations (e.g., after activation, the pale blue adsorbent layer impregnated with the Cu^{2+} cations turns white, and the pink adsorbent layer impregnated with the Co^{2+} cations turns purple-blue). Consequently, the dehydrated transition metal cations are more efficiently adsorbed by the dehydrated silica gel surface than by the non-dehydrated one and are more likely to accept lactic acid molecules as the bidentate ligands. For this reason $[\text{M}(\text{LA})_2]^{2+}$ cations tend to be less mobile on the activated adsorbent than on the non-activated one. As a result, enantiomer separations obtained on the activated adsorbent were somewhat less successful than those on the non-activated adsorbent (with the sole exception of the Mn^{2+} cation used as impregnant) and for this reason are not shown in this paper.

Additional visualization of the chromatograms by spraying them with concentrated sulphuric acid then heating at 110°C confirmed our observations and conclusions drawn from the densitometric results. On the metal cation-impregnated layers, D-(-)-lactic acid underwent carbonization and appeared as a dark brown spot and L-(+)-lactic acid appeared as a distinctly white spot on a pale beige background. Carbonization of the D-(-) antimer and no carbonization of the L-(+) isomer shows the former participates much less efficiently than the latter in complexation with the transition metal cation (migrating close to the mobile-phase front of the chromatogram), and no carbonization with the L-(+) antimer is evidently caused by protection of the L-(+)-lactic acid ligands from chemical destruction by the structure of the complex cation.

Observation of separation of the enantiomers of lactic acid on activated and non-activated plates enables formulation of some conclusions about the mechanism of the process.

Considerations on the Mechanism of Separation of the Enantiomers of L-(+)- and D-(-)-Lactic Acid

Comparison of the retention of L-(+)-lactic acid on non-impregnated and metal cation-impregnated silica gel layers enables arrangement of these layers in the following sequence of increasing R_F values:

- (i) on non-activated layers: $\text{Co}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{non-impregnated}$

(ii) on activated layers: $\text{Co}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{non-impregnated}$

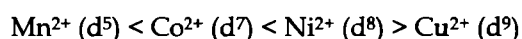
The sequence of the increasing R_F values for D-(-)-lactic acid on non-impregnated and metal cation-impregnated silica gel layers is:

(iii) on non-activated layers: $\text{Ni}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{non-impregnated} < \text{Cu}^{2+}$

(iv) on activated layers: $\text{Co}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{non-impregnated}$

From these four sequences it is apparent the Co^{2+} and Ni^{2+} cations hamper migration of L-(+) and D-(-)-lactic acid more substantially than the Cu^{2+} and Mn^{2+} cations, most probably because of the higher stability constants of the metal cation-lactic acid complexes for the first two than for the others.

From ligand-field theory [12] it is well known that the stability of the metal complexes for 3d-electron metals changes in the sequence:



which is in agreement with our TLC results.

It seems that good separation of the enantiomers of D,L-lactic acid on silica gel impregnated with the Ni^{2+} and Co^{2+} cations is because of a combination of the two factors:

- (a) the microcrystalline chirality of silica gel, very efficiently separating the two lactic acid antimers even in an absence of the transition metal cations; and
- (b) fine-tuning of the separation by formation of the respective metal cation-lactic acid complexes in the TLC systems.

The contribution by the lactic acid complexes to the overall enantiomer separation is confirmed by the lower R_F values on metal cation-impregnated layers than on non-impregnated layers; this regularity is valid for L-(+)-lactic acid chromatographed on activated and non-activated layers and also for D-(-)-lactic acid chromatographed on activated adsorbent. The contribution by the microcrystalline chirality of silica gel to the overall enantiomer separation is confirmed by the separation occurring even on the plain (i.e. unmodified) silica gel layers.

Acknowledgments

The authors wish to thank Merck KGaA (Darmstadt, Germany) for supplying the TLC plates used in our experiments. The authors also wish to thank the AR2i Company (Le Plessis Robinson, France) for supplying the Chromimage video densitometer and the Galaxie-TLC software used in the study.

References

- [1] M. Sajewicz, R. Piętka, A. Pieniak, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **15**, 131–149 (2005)
- [2] M. Sajewicz, R. Piętka, A. Pieniak, and T. Kowalska, *J. Chromatogr. Sci.*, **43**, 542–548 (2005)
- [3] M. Sajewicz, R. Piętka, A. Pieniak, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **29**, 2059–2069 (2006)
- [4] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, Ł. Wojtal, G. Grygierczyk, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **18**, 226–237 (2007)
- [5] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **20**, 209–225 (2008)
- [6] L. Cecchi and P. Malaspina, *Anal. Biochem.*, **192**, 219–221 (1991)
- [7] *Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie*, E. Merck, Darmstadt, Germany, 1984
- [8] J. McMurry, *Organic Chemistry*, Vol. 2, PWN, Warsaw, 2003 (in Polish)
- [9] M. Sajewicz, H.-E. Hauck, G. Drabik, E. Namysło, B. Głód, and T. Kowalska, *J. Planar Chromatogr.*, **19**, 278–281 (2006)
- [10] M. Sajewicz, G. Grygierczyk, M. Gontarska, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **30**, 2185–2192 (2007)
- [11] M. Sajewicz, M. Gontarska, A. Dąbrowa, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **30**, 2369–2383 (2007)
- [12] L.E. Orgel, *An Introduction to Transition-Metal Chemistry*, Methuen, London, 1960

How to Suppress the Spontaneous Oscillatory In-Vitro Chiral Conversion of α -Substituted Propionic Acids? A Thin-Layer Chromatographic, Polarimetric, and Circular Dichroism Study of Complexation of the Cu(II) Cation with L-Lactic Acid

M. SAJEWICZ, E. JOHN, D. KRONENBACH, M. GONTARSKA, M. WRÓBEL,
AND T. KOWALSKA*

Institute of Chemistry, Silesian University,
9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland
E-mail: kowalska@us.edu.pl

Summary. In our earlier investigations we showed, for the first time, with numerous practical examples that α -substituted propionic acids dissolved in the low-molecular-weight solvents are able to undergo spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion. In this study, we focused on attempting to suppress the spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion of α -substituted propionic acids using, as example, L-lactic acid dissolved in water in the presence of copper(II) cations. Our intention was to check whether the coordinate covalent bonds between copper(II) and L-lactic acid ligands prevented the latter species from oscillatory chiral conversion. To do this we stored aqueous solutions of copper(II) acetate and lactic acid in the molar ratios 1:1, 1:2, and 1:3 for a long period of time. Scrutiny of possible chiral conversion of L-lactic acid was carried out by thin-layer chromatography (TLC), polarimetry, and circular dichroism (CD) spectroscopy. Seemingly contradictory results were obtained from our investigations. From the TLC data it was apparent that chelating of copper(II) cations with L-lactic acid molecules did not result in suppression of the spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion of the acid. It was also established that different molar proportions of copper(II) cation and L-lactic acid molecules had somewhat different effects on the dynamics of conversion. In contrast, from polarimetric and circular dichroism studies it was apparent that when L-lactic acid is dissolved in water in the presence of copper(II) cations almost no chiral conversion is observed. Hence a final conclusion was drawn that chelating of copper(II) cations with L-lactic acid stabilizes the chiral structure of the acid in solution. Intermolecular interactions between the copper(II)–L-lactic acid complex and the silica gel stationary phase evidently affects the structure of the complex, however, most probably resulting in partial “liberation” of L-lactic acid ligands. Thus the chiral structure-stabilizing effect of copper(II) cations is apparently weakened by the TLC system and the freed L-lactic acid molecules can undergo chiral conversion.

Key Words: oscillatory chiral conversion, L-lactic acid, Cu(II)–lactic acid complexes, thin-layer chromatography (TLC), polarimetry, circular dichroism (CD) spectroscopy

Introduction

In earlier studies we first discovered [1] and then investigated [2–6] the spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion of selected α -substituted propionic acids dissolved in low-molecular-weight solvents. These compounds were from the group of profen drugs (*S*-ibuprofen, *S*-naproxen, *S* and *S,R*-ketoprofen, and *S* and *R*-flurbiprofen), amino acids (L-alanine, L-tyrosine, and L-phenylalanine), and hydroxy acids (L-lactic acid). Our investigation of the spontaneous in-vitro chiral conversion of α -propionic acids was performed with several experimental techniques, although the basic techniques were thin-layer chromatography (TLC) and polarimetry.

Liquid chromatography is a convenient tool for monitoring racemization and scalemization of enantiomers, as reported elsewhere [7, 8]. The ability of α -propionic acids to undergo the oscillatory chiral conversion has also been modelled theoretically [9, 10]. All the compounds studied are of substantial pharmacological and/or physiological importance, yet for a considerable amount of time recognition of their ability to undergo chiral conversion has been limited to in-vivo examples only.

It was the objective of this study to investigate whether it was possible to suppress the spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion of α -propionic acids using, as example, L-lactic acid dissolved in water in the presence of copper(II) cations. Under such conditions, L-lactic acid molecules act as bidentate ligands chelating the copper(II) cation, so the precise question was whether the coordinate covalent bonds between α -substituted propionic acid molecules and the transition metal cation can hamper spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion of the acid.

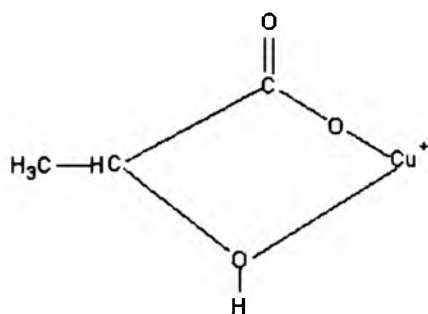
Experimental

Experimental Design

For our experiments we chose L-lactic acid (LA), because of its well described (in terms of respective equilibrium constants) ability to chelate transition metals cations. For this study we selected the copper(II) cation. We prepared three different aqueous solutions containing copper(II) cation and lactic acid anion (L) in molar ratios of 1:1, 1:2, and 1:3, respectively. In these three solutions, the molar concentration of dissolved L-lactic acid was kept constant. For a copper(II) cation to L-lactic acid anion (L) molar ratio of 1:1, one can expect formation of the bidentate complex:



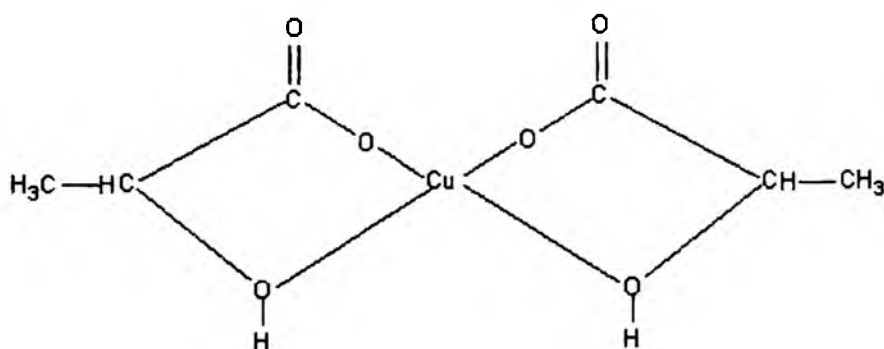
with the five-membered ring structure:



For a copper(II) cation to L-lactic acid anion (L) molar ratio of 1:2, the following chelate can be expected:



with two five-membered rings coupled by the copper(II) cation, as illustrated below:



For a copper(II) cation to lactic acid anion (L) molar ratio of 1:3, one would expect a coordination number of copper equal to 6. Because of the Jahn-Teller effect (strongly pronounced with copper having the $3d^9$ electron structure [11]) in the vast majority of copper(II) complexes, however, the coordination number of metal proves to be 4. In practice, the enthalpy of chelation between copper(II) and the third ligand is negligible and the third stability constant cannot be reliably measured.

The basic physicochemical characteristics of aqueous lactic acid solution at 25°C is given by its $\text{p}K_a$, 3.50 [12]. The first and the second stability constants of the copper(II)-lactic acid complexes (eqs (1) and (2)) are, respectively, $\log K_1 = 2.64$ and $\log K_2 = 2.15$, and the overall (cumulative) stability constant is $\log \beta_{1,2} = 4.79$ (data valid for 25°C ; [12]).

Aqueous solutions of copper(II) and lactic acid in the molar ratios 1:1, 1:2, and 1:3 were stored in tightly stoppered vials for 40 days at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ to investigate whether spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion of lactic acid molecules is still possible when they act as bidentate ligands and

give chelate complexes with copper(II). The Cu(II) cation can be viewed as a model example of the four-point receptor, able to accommodate two lactic acid molecules, each anchored by two coordinate covalent bonds.

Probable occurrence of the oscillatory chiral conversion of L-lactic acid in the presence of copper(II) cation used in three different molar proportions was checked by means of TLC, polarimetry, and circular dichroism (CD) spectroscopy.

Thin-Layer Chromatography (TLC)

TLC was performed on three aqueous solutions prepared from L-lactic acid (Fluka, Buchs, Switzerland; #69771) and analytical grade copper(II) acetate monohydrate (POCH, Gliwice, Poland):

- (i) a solution of copper(II) acetate and L-lactic acid in the molar ratio 1:1; concentrations of copper(II) acetate and L-lactic acid both $2.78 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$;
- (ii) a solution of copper(II) acetate and L-lactic acid in the molar ratio 1:2; concentrations of copper(II) acetate and L-lactic acid 1.39×10^{-1} and $2.78 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$, respectively; and
- (iii) a solution of copper(II) acetate and L-lactic acid in the molar ratio 1:3; concentrations of copper(II) acetate and L-lactic acid 9.25×10^{-2} and $2.78 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$, respectively.

These solution were stored at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ in tightly stoppered vials for 40 days, during which time they were used for the TLC quantification of chiral conversion yield of L-lactic acid as a function of time.

We also prepared an aqueous solution of L-lactic acid (concentration $2.78 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$, i.e. 25 g L^{-1}) without an addition of copper(II) acetate, to check time changes of retardation coefficient (R_F) values for lactic acid in the absence of the copper(II) cation.

All these solutions were prepared in double-distilled water.

TLC was performed on $20 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$ commercial glass plates pre-coated with 0.25 mm layers of silica gel (Merck, Darmstadt, Germany; #1.05715). Before use the plates were developed with methanol-water 9:1 (v/v), to wash impurities from the adsorbent layer, then dried in air at ambient temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) for 3 h.

All solutions were applied to the plates, 1 cm above the lower edge of the plate, by use of a Desaga (Heidelberg, Germany) AS 30 model automatic applicator; the volume applied was $10 \mu\text{L}$ per band. Nine samples were applied to each plate. The first three spots on each plate were sample (i), the next three spots were sample (ii), and the last three spots were sample (iii).

Samples of L-lactic acid without an addition of copper(II) acetate were applied to separate plates. All samples were applied 2 cm apart. Chromatograms were developed at $22 \pm 2^\circ\text{C}$, to a distance of 8.5 cm, by one-dimensional development with dioxane–water 9:1 (*v/v*) as mobile phase. TLC analyses were performed for 15 days, usually at 24-h intervals, and the last experiment was performed 30 days after sample preparation. Each experiment was repeated three times.

After development, the plates were dried for 3 h at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and then scanned densitometrically, in the direction of development, by use of a Desaga model CD 60 densitometer equipped with Windows-compatible ProQuant software. For samples (i)–(iii) measurements were performed at 240 nm using the UV light beam from the mercury lamp; the slit geometry was $0.1 \text{ mm} \times 1.0 \text{ mm}$. Samples of L-lactic acid without addition of copper(II) acetate were scanned at 200 nm. Maxima of separated chromatographic peaks 1 and 2 were used for calculation of respective retardation coefficient (R_F) values, and peak areas were used for estimation of the percentage yields of the two separated entities.

Because of the relatively lower R_F value of peak 1, its area was quantified directly from the chromatograms. Peak 2 was located in the proximity of, and partially overlapping, the mobile phase front line, where impurities from the plate, with their own absorption, accumulate. The area of peak 2 was obtained by subtracting the peak area of the mobile phase front line alone (measured between two peaks) from the peak area of the mobile phase front line plus the partially overlapping lactic acid peak. Because peak 2 areas were measured indirectly in this way, the results presented in this study should be regarded as semi-quantitative estimates only.

Polarimetry

Measurements of the specific rotation ($[\alpha]_D$) of aqueous solutions of the copper(II) acetate–L-lactic acid mixtures were performed at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ for the freshly prepared samples and also for those stored for 10 days. Specific rotation of the samples was checked with a Polamat A polarimeter (Carl Zeiss, Jena, Germany). The samples studied were:

- (1) a solution of copper(II) acetate and L-lactic acid in the molar ratio 1:1; concentrations of both copper(II) acetate and L-lactic acid $5.55 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$;
- (2) a solution of copper(II) acetate and L-lactic acid in the molar ratio 1:2; concentration of copper(II) acetate $2.78 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ and that of L-lactic acid $5.55 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$;

- (3) a solution of copper(II) acetate and L-lactic acid in the molar ratio 1:3, concentration of copper(II) acetate $1.85 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ and that of L-lactic acid $5.55 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$.

The optical path length of the measurement cell was exactly 10 cm (1 dm) and its volume was ca. 1 mL. The specific rotation ($[\alpha]_D$) was calculated as:

$$[\alpha]_D \times 100 \alpha / cd \quad (3)$$

where α is the measured rotation (in degrees), D is the wavelength, 589 nm, which corresponds to the sodium D line, c is the concentration of the compound in g (100 mL) $^{-1}$ solution, and d is the sample thickness in dm.

Circular Dichroism (CD) Spectroscopy

The CD spectra of samples (i)–(iii) used in TLC and stored for the period of 40 days were acquired at room temperature on a Jasco (Oklahoma City, OK, USA) J-815 spectropolarimeter. Step scans were collected at 0.2 nm per step with an integration time of 1 s over the range 300–900 nm. Samples were examined in cells 0.1 cm thick.

Measurements were performed on samples (i)–(iii) for 5 h at 20-min intervals, to monitor the chiral stability of L-lactic acid as a function of time.

UV Absorption Spectroscopy

Aqueous solutions of copper(II) acetate and L-(+)-lactic acid in the molar ratios 1:1, 1:2, and 1:3 were prepared as described below:

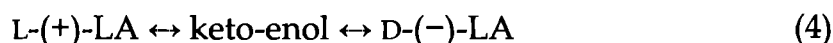
- (a) a solution of copper(II) acetate and L-lactic acid in the molar ratio of 1:1; concentrations of both copper(II) acetate and L-lactic acid $5.55 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$;
- (b) a solution of copper(II) acetate and L-lactic acid in the molar ratio of 1:2; concentration of copper(II) acetate $1.39 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ and that of L-lactic acid $2.78 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$;
- (c) a solution of copper(II) acetate and L-lactic acid in the molar ratio of 1:3; concentration of copper(II) acetate $9.25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ and that of L-lactic acid $2.78 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

UV absorption spectra in the range 200 to 350 nm were recorded with a Genesys 6 spectrophotometer (Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA) in quartz cells of path length 1 cm. The primary purpose of acquiring these

spectra was to select the wavelength most suitable for densitometric scanning of the chromatograms.

Results and Discussion

The objective of this study was to investigate whether use of the optically pure L-lactic acid as a chelating ligand can stabilize its steric structure and suppress its spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion, described elsewhere [6, 13]. This conversion can be represented in a simplified form as:



and involves the keto-enol form of lactic acid as an intermediate structure between the two chiral antipodes, L and D. The spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion is typical of many α -substituted propionic acid derivatives, when dissolved in the low-molecular-weight solvents, as reported, elsewhere [1–6, 9, 10, 13].

In this experiment, we used the copper(II) cation, in the form of copper(II) acetate dissolved in water. L-Lactic acid plays an important physiological role and it therefore seemed important to examine possibilities of stabilizing its steric structure by hampering the oscillatory chiral conversion. Metabolic pathways in biological systems often engage receptors that can anchor interacting molecules through more than one binding site. To this effect, in our experiment we used copper(II) cation as a model of a receptor offering the two-point anchorage to a single lactic acid molecule and able to accommodate two such molecules, binding them through coordinate covalent bonds.

Thin-Layer Chromatography (TLC)

Thin-layer chromatographic examination of the chiral stability of L-lactic acid acting as chelating ligand for the copper(II) cation consisted in an attempt to separate the investigated lactic acid (LA) solutions on silica gel layers, according to the method proposed elsewhere [13]. It was easily shown that the D antimer was spontaneously formed according to the scheme presented in eq. (4). *Figs 1* and *2* show, respectively, typical examples of a videoscans of a chromatogram and a 3D densitogram. In qualitative terms, *Figs 1* and *2* are typical of all the chromatograms and densitograms recorded in this study.

In *Fig. 3*, we present plots of retardation coefficient (R_F) as a function of time for peak 1 from the chromatograms obtained from aqueous solutions

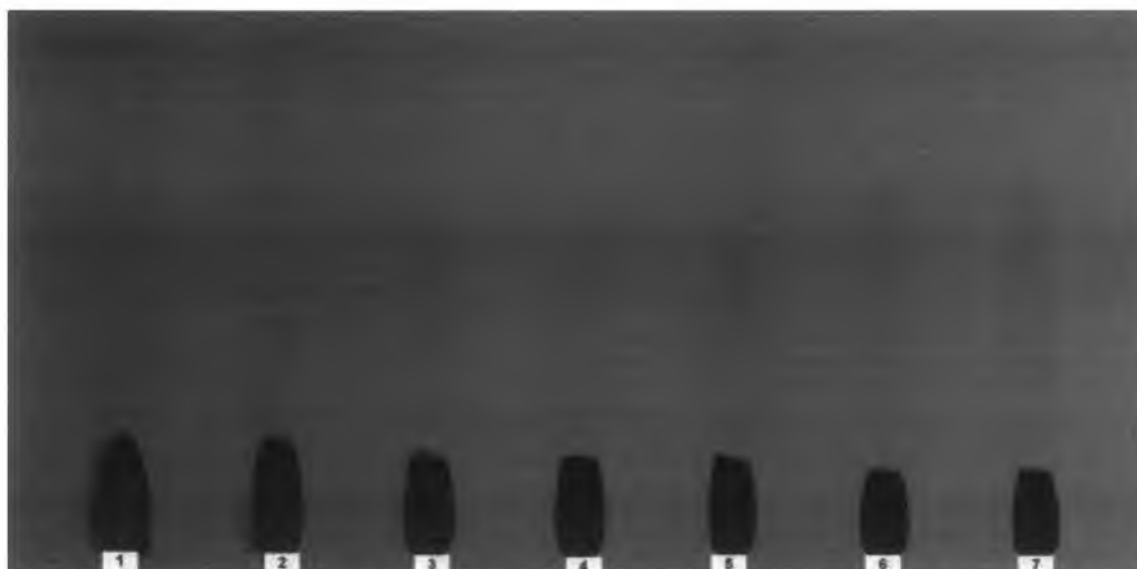


Fig. 1. Videoscans of the chromatogram obtained at 254 nm from aqueous lactic acid (LA) and copper(II) acetate solution, stored for 8 days at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Lanes 1 and 2, Cu(II):LA, 1:1; lanes 3–5, Cu(II):LA, 1:2; lanes 6 and 7, Cu(II):LA, 1:3

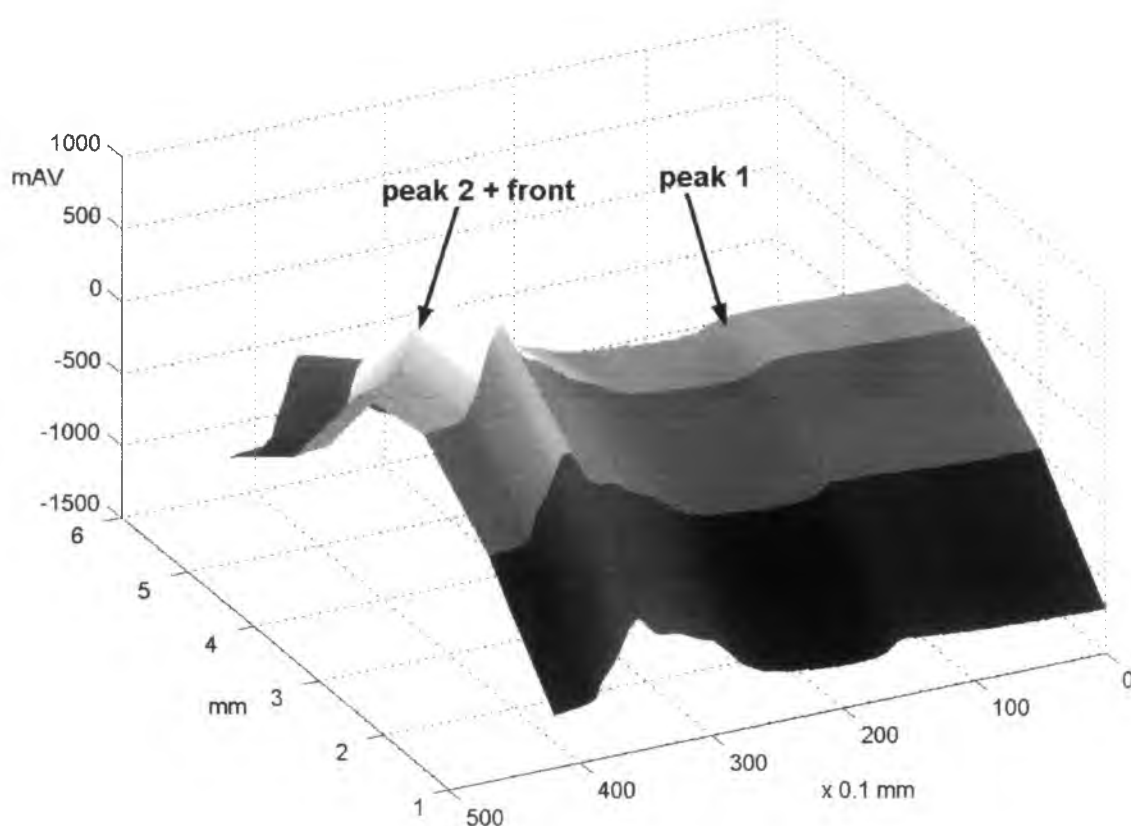


Fig. 2. 3D densitogram showing enantiomer separation of peaks 1 and 2 from an aqueous solution LA and copper(II) acetate in the molar ratio 3:1, stored for 7 days at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ (with indicated overlap of the concentration profile of peak 2 with the mobile phase front line)

of L-lactic acid and copper(II) cation in the molar ratios 1:1, 2:1, and 3:1, and, for comparison purposes, the analogous plot for aqueous L-lactic acid solution stored in the absence of copper(II) cation.

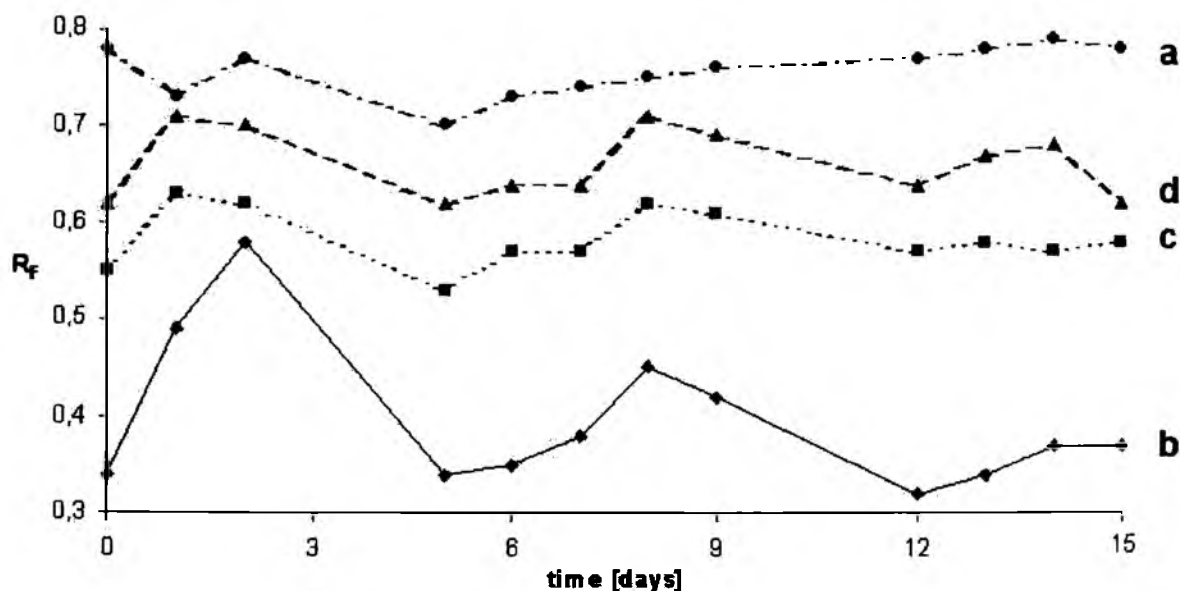


Fig. 3. Dependence on storage time at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ of the retardation coefficient R_F ($R_F = f(t)$) for peak 1. Aqueous lactic acid (LA) solutions were stored for 15 days at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ (a) without addition of copper(II) acetate, and with addition of copper(II) acetate in the Cu(II) to LA molar ratios 1:1 (b), 1:2 (c), and 1:3 (d)

From the literature [13–15] it is apparent that peak 1 represents the sum of $[\text{Cu}(\text{L-LA})]^+$, $[\text{Cu}(\text{L-LA})_2]$, and unbonded L-lactic acid, whereas peak 2 represents the sum of $[\text{Cu}(\text{D-LA})]^+$, $[\text{Cu}(\text{D-LA})_2]$, and unbonded D-lactic acid (in relative proportions depending on the quantitative composition of the starting mixture). With lactic acid stored in the absence of copper(II) cation, peak 1 represents L-lactic acid and peak 2 represents D-lactic acid.

The $R_{F(1)}$ values (valid for peak 1) measured for the components of the solutions investigated can be arranged in the sequence (Fig. 3):

$$\text{Cu(II):LA, 1:1} < \text{Cu(II):LA, 1:2} < \text{Cu(II):LA, 1:3} < \text{LA} \quad (5)$$

and the $R_{F(2)}$ values (valid for peak 2) can be arranged in the analogous sequence.

From this sequence it is apparent that retardation of a given lactic acid antimer stored in the absence of copper(II) cations is the least pronounced, and for the copper(II) to LA ratio of 1:1 the relatively greatest retardation of the species represented by peaks 1 and 2 is observed. In view of these data, it seems clear that the predominant contribution to retardation in the pres-

ence of copper(II) cations is from intermolecular interactions between the electron vacancies of the metal and the non-bonding electron pairs from the silanol and siloxane oxygen atoms of silica gel. The higher the proportion of lactic acid to copper(II) in the stored solution, the less pronounced is the retardation effect on the respective Cu(II)-LA complexes. In the absence of copper(II) cation, retardation of lactic acid is basically because of hydrogen bonding of carboxyl and hydroxyl groups of lactic acid with silanols and siloxanes on the silica (because the enthalpies of the hydrogen bonds are lower than those of the coordinate covalent bonds).

The time changes of the $R_{F(1)}$ values shown in Fig. 3 most probably arise because all species included in peak 1 are simultaneously present in the chromatographic system and quantitative proportions among them change, because of oscillatory chiral conversion. Our assumption seems supported by visual inspection of the concentration profiles of peak 1. An example is given in Fig. 4; the non-symmetrical peak envelope with a rich subtle structure reveals different entities, jointly quantified as peak 1 (the same phenomenon applies to peak 2, also). It should also be added that the total areas under peaks 1 and 2—despite their lack of symmetry and subtle structure—were used as equivalents to their respective quantitative proportions.

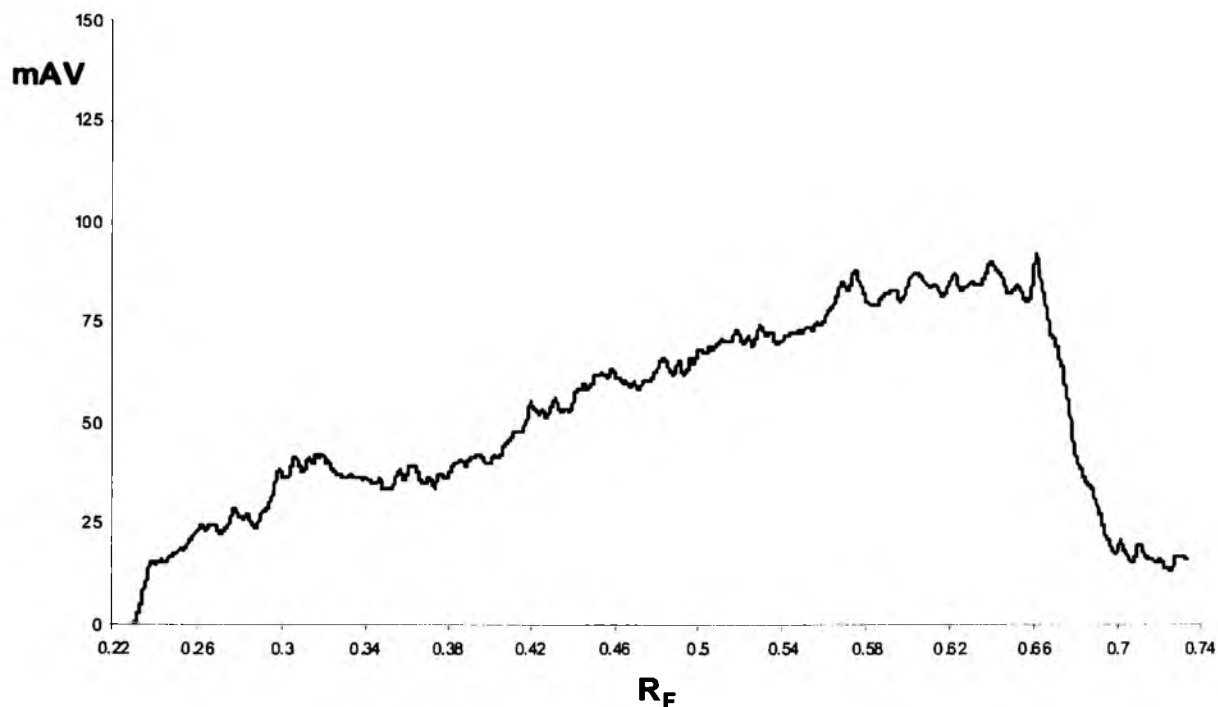


Fig. 4. Densitogram of peak 1 recorded from the chromatogram obtained from an aqueous solution of lactic acid and copper(II) acetate in a molar ratio of 3:1 stored for 13 days at $22 \pm 2^\circ\text{C}$

The UV absorption spectra of copper(II) acetate–lactic acid solutions in the molar proportions of 1:1, 1:2, and 1:3 are shown in Fig. 5. Considering the molar concentrations of copper(II) acetate and L-lactic acid in solutions (1)–(3) and the resulting absorption signals, it can be concluded that the respective molar extinction coefficients for the three examined solutions are comparable. Hence, it seems correct that in this semi-quantitative analysis densitometric areas for peaks 1 and 2 were indicative of the concentrations of the respective chemical species.

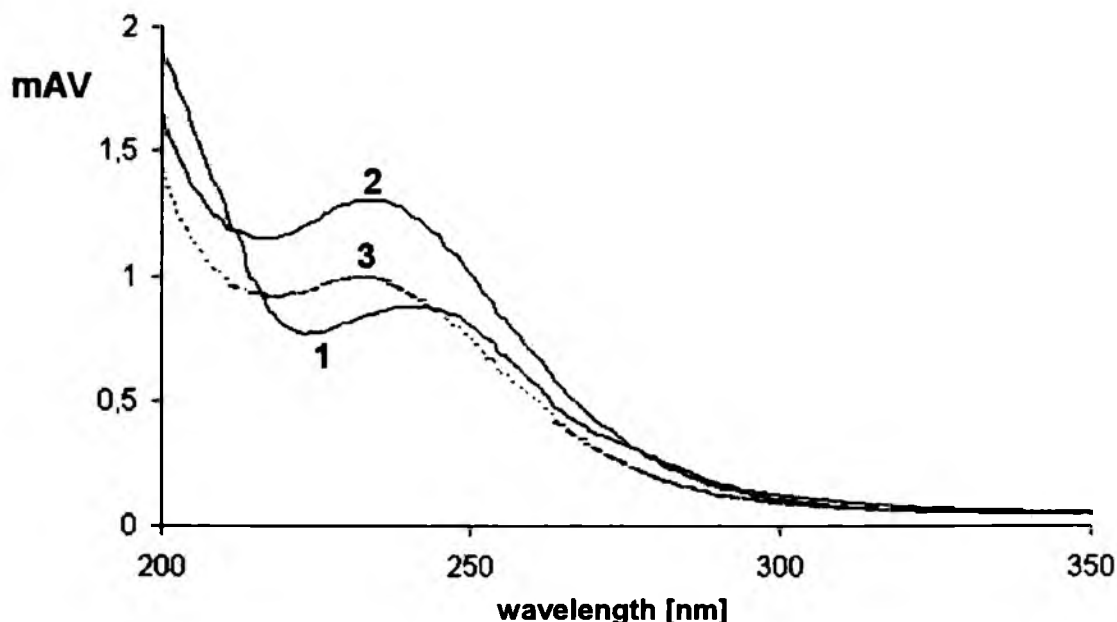


Fig. 5. UV spectra of aqueous copper(II) acetate–L-lactic acid mixtures in the molar ratios (1) 1:1, (2) 1:2, and (3) 1:3, recorded in the wavelength range 200 to 350 nm

The results that directly address the main issue of this study are shown in Fig. 6 a–c. From these results it is apparent that in this TLC system suppression of the oscillatory chiral conversion of L-lactic acid by copper(II) cation (even with the most favourable Cu(II) to LA molar ratio of 1:2) was not observed. The three samples were checked for 15 days and within this time range occasional changes of quantitative proportions between peak 1 and peak 2 were recorded for each sample. We checked the same three samples again after storage for 30 days; the results obtained are shown in Table I. These data confirm that the least pronounced chiral conversion of L-lactic acid was achieved for the copper(II) to LA molar ratio of 1:2 and that molar ratios 1:1 and 1:3 were less favourable.

The results obtained lead to the question: Did the demonstrated chiral conversion of L-lactic acid to its D antipode in the aqueous solutions of the three Cu(II)–LA mixtures occur before the TLC experiment or was it in-

duced by intermolecular interactions of L-lactic acid with constituents of the chromatographic system (in the first instance, with the adsorbent)? In the other words, this is a question about the performance of the copper(II) cation in the stabilization of chiral conversion of L-lactic acid. In a search for an answer to this question we examined three different Cu(II)-LA solutions by polarimetry and CD spectroscopy.

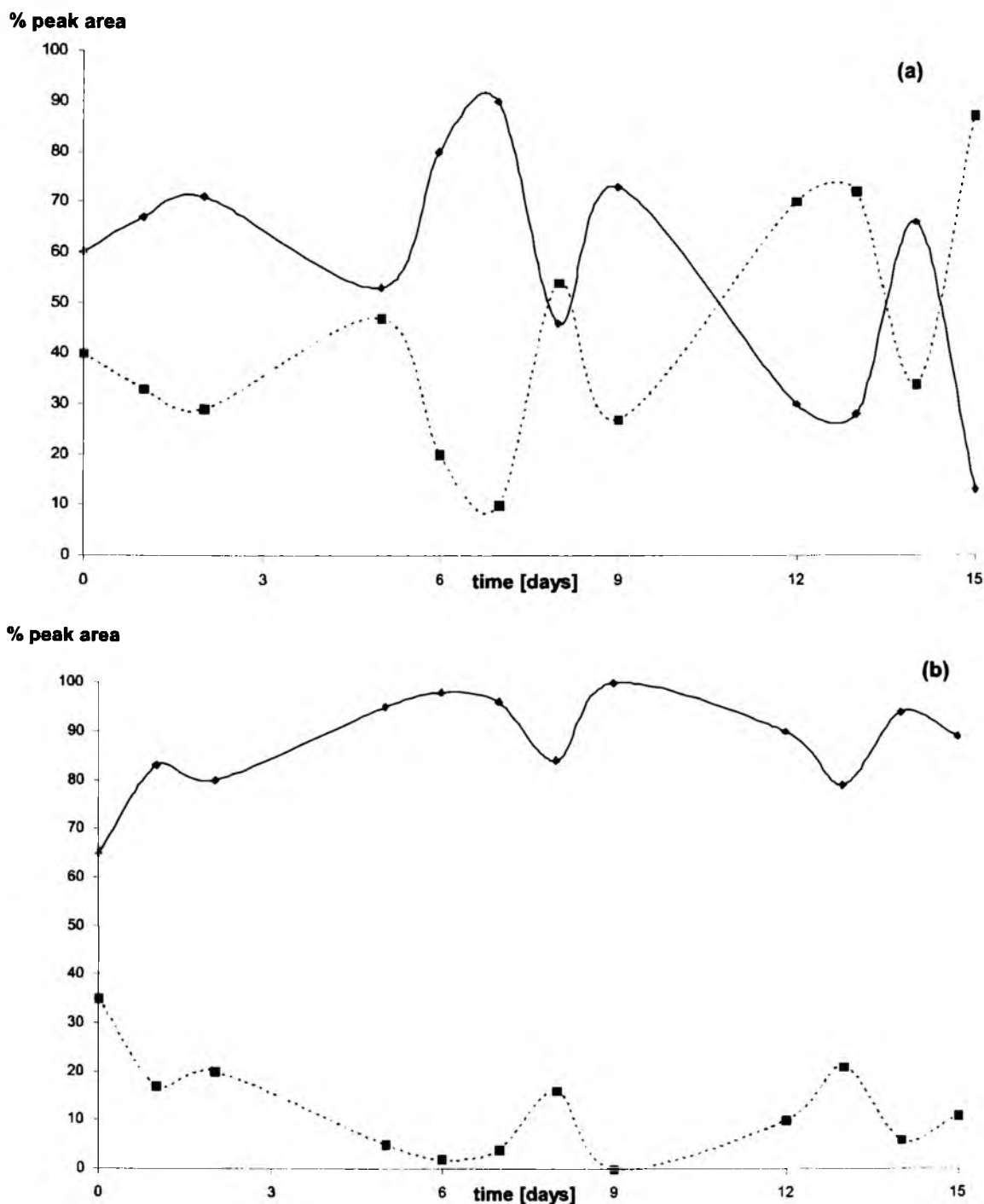


Fig. 6.

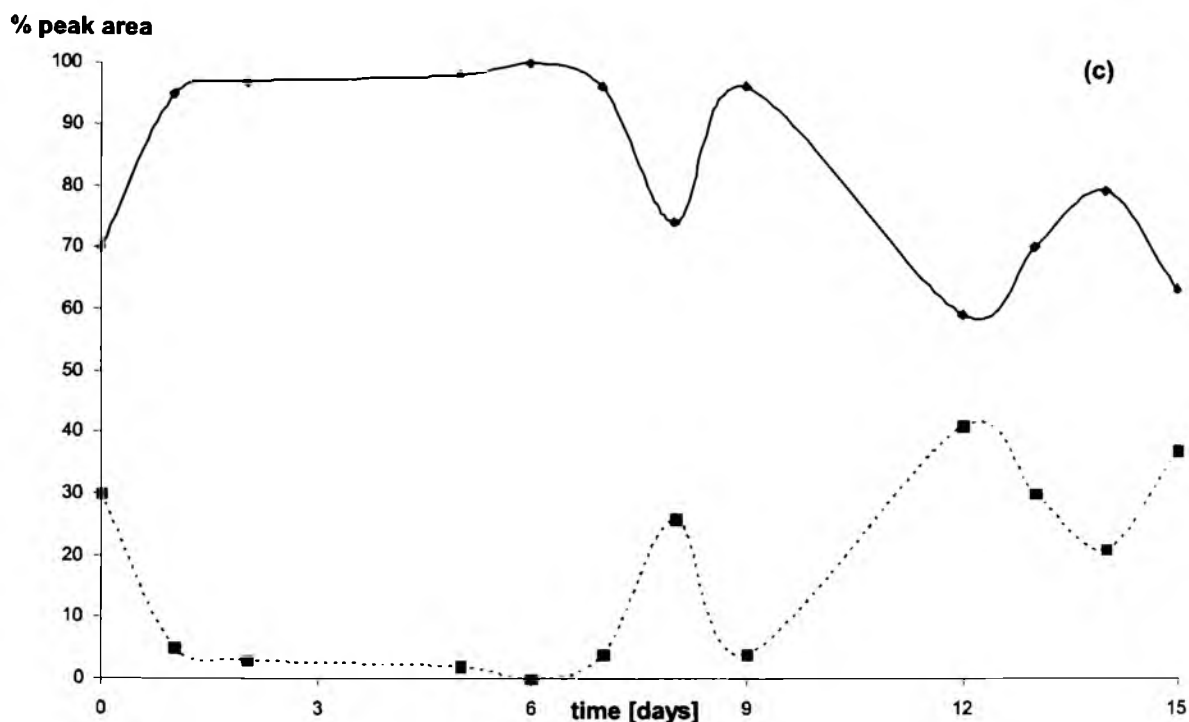


Fig. 6. Thin-layer chromatographic estimation of the changing relative contributions (%) of peak 1 (solid line) and peak 2 (dashed line) to the overall amount of lactic acid (LA) (taken as the sum of peaks 1 and 2) for aqueous solutions of copper(II) acetate-L-lactic acid in the molar ratios (a) 1:1; (b) 1:2; and (c) 1:3. Storage temperature: $22 \pm 2^\circ\text{C}$

Table I. Estimation of the relative contributions (%) of peaks 1 and 2 to the sum of the two peak areas (taken as 100%) after storage for 30 days of aqueous solutions of copper(II) acetate-L-lactic acid (LA) in the molar ratios 1:1, 1:2, and 1:3.

Storage temperature: $22 \pm 2^\circ\text{C}$

Peak	Relative contribution (%)		
	1:1	1:2	1:3
1	60	74	13
2	40	26	87

Polarimetry

Polarimetric measurements of specific rotation ($[\alpha]_D$) for aqueous solutions of the three different copper(II) acetate-L-lactic acid mixtures (with Cu(II) to L-LA molar ratios of 1:1, 1:2, and 1:3) were conducted on freshly prepared samples and on those stored for ten days. These measurements revealed very good stability of the respective $[\alpha]_D$ values in the period of time investigated for mixtures with the molar ratios 1:2 and 1:3, as shown in Table II.

In contrast, for the sample with copper(II) acetate-L-lactic acid in the molar ratio 1:1, continuous and vigorous oscillatory changes of the specific rotation ($[\alpha]_D$) in the range from -1.5° to $+3.0^\circ$ were observed (the $[\alpha]_D$ value of pure L-lactic acid is ca $+2.6^\circ$). Comparison of the $[\alpha]_D$ values for the 1:1 sample with the chiral stability-indicating results from CD spectroscopy leads, however, to the provisional assumption that these dynamic oscillatory changes might be physical rather than chemical in nature (possibly because of structural rearrangement of supramolecular entities within the 1:1 copper(II) acetate - L-lactic acid solution). Thus the general conclusion can provisionally be drawn that complexation of copper(II) cation with L-lactic acid ligands seems to result in effective stabilization of their chiral structure.

Table II. Specific rotation ($[\alpha]_D$) values for aqueous solutions of copper(II) acetate-L-lactic acid (LA) in the molar ratios 1:2, and 1:3. The storage temperature was $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and the storage time ten days. (The $[\alpha]_D$ values were checked for fresh samples and also for those after storage for ten days)

Cu(II):LA molar ratio	$[\alpha]_D$ ($^\circ$)	Standard deviation, σ^* ($^\circ$)
1:2	-26.41	0.64
1:3	-18.87	0.54

* $n = 20$ measurements

Circular Dichroism (CD) Spectroscopy

From a study on assignment of the configuration of α -hydroxy acids from the CD spectra of their complexes with cuprammonium solution (Cupra A) [16] it is apparent that compounds with the *R* configuration at the α carbon atom have positive and negative Cotton effects at approximately 600 and 720 nm, respectively, whereas *S*- α hydroxy acids have negative and positive Cotton effects, respectively, at approximately the same wavelengths. It has also been reported that for CD spectra of one chiral type there are no significant concentration-dependent differences between the shapes of CD curves, and positions of CD maxima and their amplitudes [16]. These findings proved a convenient starting point for our own CD spectroscopic examination of copper(II)-L-lactic acid solutions stored for 40 days.

With polarimetrically established stability of the specific rotation ($[\alpha]_D$) for the aqueous copper(II) acetate-lactic acid solutions (especially those in the molar proportions 1:2 and 1:3), we were interested in the checking chiral configuration of lactic acid in the three samples investigated. As an example, the CD spectrum of the aqueous solution of copper(II)-L-lactic acid in the molar ratio 1:1 is shown in Fig. 7. The CD spectra of the solutions of cop-

per(II)-L-lactic acid in the molar ratios 1:2 and 1:3 are fully analogous with that shown in Fig. 7 (in terms of the shapes of CD curves, and positions of CD maxima and the amplitudes).

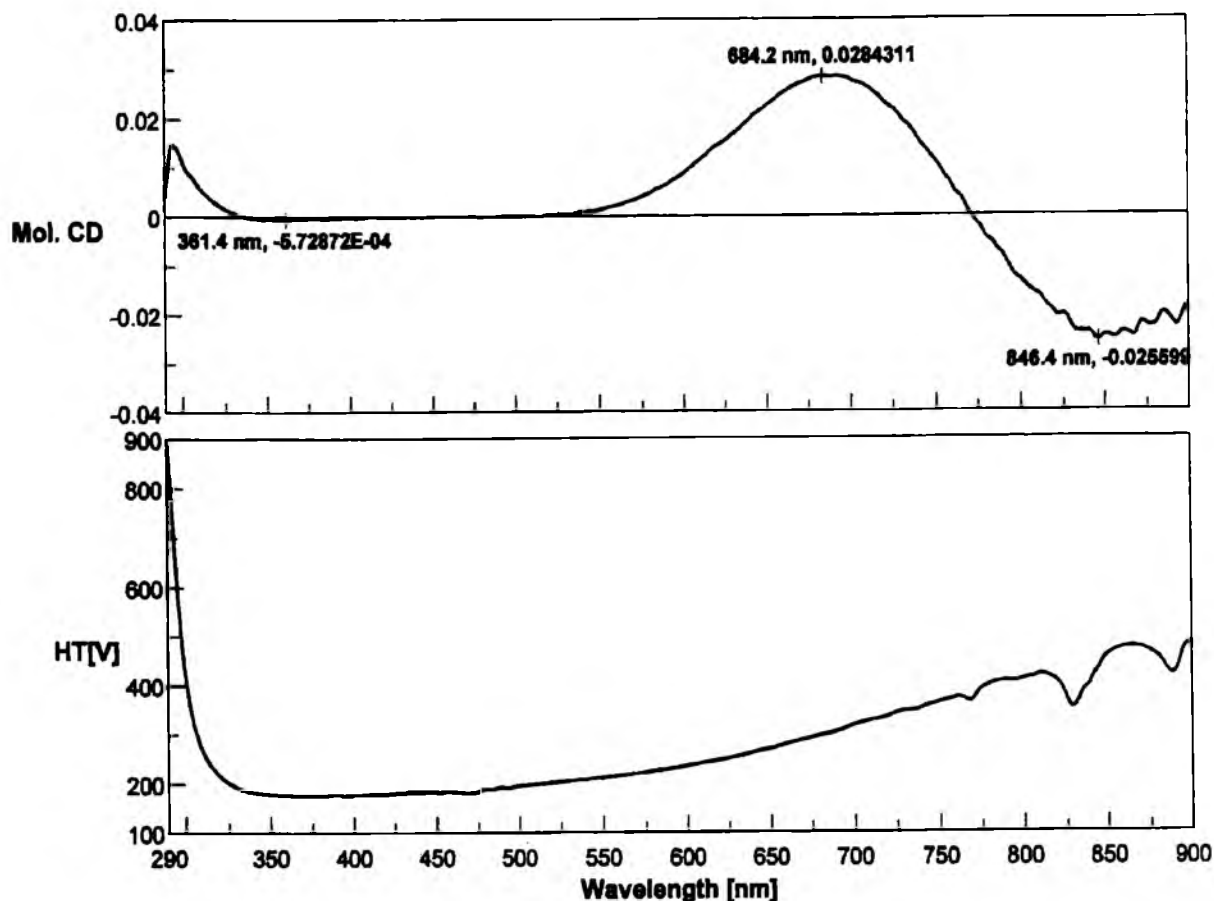


Fig. 7. CD (upper) and UV (lower) spectra recorded in the wavelength range 290–900 nm for an aqueous solution of Cu(II)-L-lactic acid in the molar ratio 1:1 (sample stored for 40 days at $22 \pm 2^\circ\text{C}$)

Because L-lactic acid is dextrorotatory, CD spectra of its complexes with the copper(II) cation should be characteristic of the *R* configuration and, indeed, the three CD spectra run for Cu(II)-LA solutions prepared in the molar ratios 1:1, 1:2, and 1:3 show the first (positive) Cotton effect at 684, 699, and 698 nm, respectively, and the second (negative) effect at 846, 848, and 867 nm, respectively. In general terms, the shapes of CD curves of lactic acid complexes with copper(II) acetate resemble those of many *R*- α -hydroxy acid complexes with Cupra A, reported elsewhere [16]. The same Cu(II)-LA solutions were also checked for a period of 5 h at 20-min intervals to assess the chiral stability of L-lactic acid as a function of time, and this stability was convincingly confirmed.

Thus CD spectroscopic evidence showed that lactic acid in the presence of copper(II) acetate preserves the initial L structure, despite storage of the aqueous samples for 40 days. This evidence confirms that the polarimetrically demonstrated instability of the 1:1 copper(II) acetate–L-lactic acid solution was because of supramolecular rearrangement of the entities present rather than chiral conversion of the L-lactic acid ligands.

Conclusions

From results obtained by means of TLC, polarimetry, and CD spectroscopy, the following conclusions can be drawn:

- Storage of aqueous solutions of L-lactic acid and copper(II) acetate in the molar ratios 1:1, 2:1, and 3:1 results in good stabilization of the chiral structure of L-lactic acid by the chelating coordinate covalent bonds, as confirmed by polarimetric and CD spectroscopic results;
- TLC investigation revealed the presence of D-lactic acid in the samples. This seems to be because of intermolecular interactions between the copper(II)–L-lactic acid complexes and the silica gel stationary phase. These solid–liquid interface interactions evidently affect complex structure, resulting in at least partial ‘liberation’ of L-lactic acid ligands from this structure. Thus, the chiral structure-stabilizing effect of copper(II) cations is, in the TLC system, substantially weakened and the freed L-lactic acid molecules can undergo chiral conversion.

Acknowledgement

The authors wish to thank Merck KGaA (Darmstadt, Germany) for supplying the TLC plates used in our experiments. The authors also wish to thank the AR2i Company (Le Plessis Robinson, France) for supplying the Chromimage video densitometer and the Galaxie-TLC software used in the study.

References

- [1] M. Sajewicz, R. Piętko, A. Pieniak, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **15**, 131 (2005)
- [2] M. Sajewicz, G. Grygierczyk, M. Gontarska, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **30**, 2185 (2007)
- [3] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, Ł. Wojtal, G. Grygierczyk, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **18**, 226 (2007)
- [4] M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, and T. Kowalska, *J. Planar Chromatogr.*, **21**, 43 (2008)
- [5] M. Sajewicz, D. Kronenbach, D. Staszek, M. Wróbel, G. Grygierczyk, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **31**, 2006 (2008)
- [6] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **20**, 209 (2008)
- [7] C. Wolf, *Chem. Soc. Rev.*, **34**, 595 (2005)
- [8] C. Wolf, *Dynamic Stereochemistry of Chiral Compounds: Principles and Applications*, RSC Publishing, Cambridge, UK, 2008
- [9] M. Sajewicz, M. Gontarska, Ł. Wojtal, D. Kronenbach, M. Leda, I.R. Epstein, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* **31**, 19866 (2008)
- [10] M. Sajewicz, R. Wrzałik, M. Gontarska, D. Kronenbach, M. Leda, I.R. Epstein, and T. Kowalska. *In-Vitro Chiral Conversion, Phase Separation and Wave Propagation in Aged Profen Solutions*. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* (submitted for publication)
- [11] L.E. Orgel, *An Introduction to Transition Metal Chemistry. Ligand-Field Theory*, Methuen, London, 1960
- [12] L.D. Pettit and K.J. Powell, *Stability Constants SC—Database*, IUPAC and Academic Software 1993–2000
- [13] M. Sajewicz, E. John, D. Kronenbach, M. Gontarska, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **20**, 367 (2008)
- [14] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, and T. Kowalska, unpublished results
- [15] L. Cecchi and P. Malaspina, *Anal. Biochem.*, **192**, 219 (1991)
- [16] J. Frelek, M. Geiger, and W. Voelter, *Tetrahedron Asymmetry*, **10**, 863 (1999)

TLC in a Search for Structural Limitations of Spontaneous Oscillatory In-Vitro Chiral Conversion. α -Hydroxybutyric and Mandelic Acids

Mieczysław Sajewicz, Dorota Kronenbach, Monika Gontarska, Magdalena Wróbel, Robert Piętka, and Teresa Kowalska*

Key Words

Oscillatory chiral conversion
Enantiomer separation
TLC
Polarimetry
 α -Hydroxybutyric acid
Mandelic acid

Summary

As a result of our earlier studies, we were the first research group to report the spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion of a considerable number of α -substituted propionic acids (i.e., selected profens, amino acids, and L-lactic acid). It is noteworthy that TLC proved highly instrumental in collecting relevant confirmatory evidence on this issue. Besides, in two papers we introduced a theoretical model and with its aid, we could simulate basic physical and physicochemical features of the discussed process. Reflecting on the oscillatory chiral conversion, we realized that it seems to be a rather general phenomenon and we started contemplating its scope and limitations. It became our primary concern to check whether it is confined to α -substituted propionic acids only or can occur with other classes of chiral compounds also. To this effect, in this study we present empirical (thin-layer chromatographic and polarimetric) evidence on an ability of *R* and *S*- α -hydroxybutyric acids, and *R* and *S*-mandelic acids to undergo spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion when dissolved in 70% aqueous ethanol. From the obtained results, general conclusion can be drawn that the process of interest occurs not only with chiral carboxylic acids having three carbon atoms per molecule, but also with those having two and four carbon atoms.

1 Introduction

The chiral instability of many compounds is well established and well documented, especially with compounds of pharmacological, biological, or related importance and it often results in chiral conversion (in our earliest papers referred to as transesterification) (for example Refs 1–3). As a matter of fact, incomparably more attention has been paid by the scientific community (and for obvious safety reasons) to chiral conver-

sion of drugs (generally, taking place in vivo), than to any other chiral instability and conversion-related problem.

Chiral conversion is not an easy phenomenon to monitor, because enantiomer separation remains among the most challenging separation tasks. For the time being, chromatographic techniques – despite their often imperfect performance – seem the best suited for the task of enantiomer separation and, hence, for monitoring the phenomenon of chiral conversion. In 2005, an interesting and helpful review paper was published by Wolf [4], summarizing experimental evidence from analysis of stereolabile chiral compounds by dynamic chromatography and stopped-flow methods. In 2008, Wolf published a book which focuses on the same issue and discusses it in a much greater detail [5].

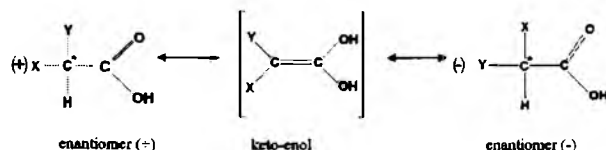
Original research papers reviewed elsewhere [4, 5], basically referred to simple (i.e., irreversible) chiral conversion, as monitored by instrumental analytical techniques. In 2005, the first paper was published by our research group [6] that referred to spontaneous oscillatory chiral conversion of profens, as monitored by TLC. In that pioneering paper we for the first time demonstrated high potential of TLC for study of spontaneous oscillatory (and not unidirectional only) chiral conversion of selected drugs. Moreover, it was the first report on chiral conversion of profens occurring in vitro. Since that first publication, further reports have been published by our group on similar effects recorded by TLC and referring to selected amino acids (for example Refs 7 and 8) and L-lactic acid (for example Ref. 9).

In other papers [10, 11] a theoretical explanation was given of the spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion of α -substituted propionic acids. Our approach was based on an earlier Templator model of an oscillator [12, 13], and because of the coupled effect of the oscillatory chiral conversion with a pair of antimers from our studies, it was named the model of two linked Templators.

With time, the list of chemical compounds undergoing confirmed spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion expanded and it became a matter of our concern to reflect on the

M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, M. Wróbel, R. Piętka, and T. Kowalska, Institute of Chemistry, Silesian University, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland.
E-mail: kowalska@us.edu.pl

scope and structural limitations with the compounds able to undergo this process, and also on the ways and means to successfully hamper it. In general terms, the oscillatory chiral conversion can be summarized by the equation [6–11, 14]:



where X and Y are two different substituents of the α -carbon atom coupled to the carboxyl group.

In Ref. 15 we presented the results of our study on hampering the spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion of L-lactic acid dissolved in water in the presence of the copper(II) cation. In the system investigated, L-lactic acid molecules acted as chiral ligands chelating the metal cation through coordinate covalent bonds and the chiral stability of this system was checked by polarimetry, circular dichroic spectroscopy (CD), and TLC.

As all previous cases of the documented oscillatory chiral conversion were observed with α -substituted propionic acids only, we started contemplating the structural scope and limitations of the compounds able to undergo this process. In this study, we investigate two α -substituted butyric acids (*R* and *S*- α -hydroxybutyric acid), and two α -substituted acetic acids (*R* and *S*-mandelic acid) for their ability to undergo the spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion in ethanol–water 7:3 (v/v). The results obtained by TLC and polarimetry are presented and discussed in this paper.

2 Experimental

2.1 Chiral Analytes

2.1.1 α -Hydroxybutyric Acids

The structural formulas of *S* and *R*- α -hydroxybutyric acid are given in Figure 1. In our study, we used samples of *S* and *R*- α -

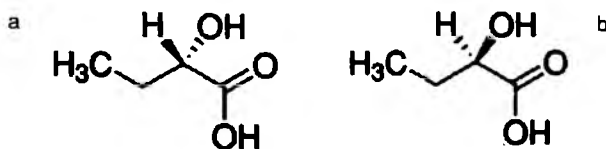


Figure 1

The chemical structures of (a) *S*- α -hydroxybutyric acid and (b) *R*- α -hydroxybutyric acid.

hydroxybutyric acid manufactured by Fluka (Buchs, Switzerland; #54918 and 54917, respectively).

For the 1D TLC we used solutions of the α -hydroxybutyric acid enantiomers in ethanol–water 7:3 (v/v); their respective concentrations were 50 g L⁻¹ (4.80×10^{-1} mol L⁻¹). For 2D development and polarimetry, we used solutions in the same binary solvent mixture; their respective concentrations were 150 g L⁻¹ (1.44 mol L⁻¹). For 2D development we also used the racemic mixture *S,R*-(\pm)-hydroxybutyric acid dissolved in ethanol–water

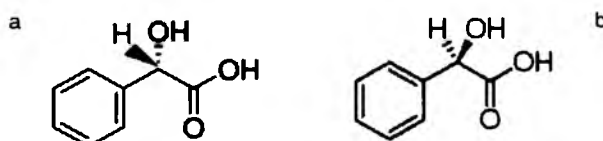


Figure 2

The chemical structures of (a) *S*-(+)-mandelic acid and (b) *R*-(-)-mandelic acid.

7:3 (v/v) in which the concentrations of the two antimers were each 75 g L⁻¹ (0.72 mol L⁻¹).

Methanol and dioxane used in our experiments were of HPLC purity grade (Merck, Darmstadt, Germany), ethanol was of analytical purity grade (POCh, Gliwice, Poland), and water was double-distilled and de-ionized in our laboratory.

2.1.2 Mandelic Acids

The structural formulas of *S*-(+) and *R*-(-)-mandelic acid are given in Figure 2. In our study, we used samples of *S*-(+) and *R*-(-)-mandelic acid manufactured by Sigma–Aldrich (St Louis, MO, USA; #M2004 and 154210, respectively).

For 1D thin-layer chromatography we used solutions of the mandelic acid enantiomers in ethanol–water 7:3 (v/v); their respective concentrations were 42.5 g L⁻¹ (2.79×10^{-1} mol L⁻¹). For 2D development and polarimetry we used solutions in the same solvent mixture; their respective concentrations were 85 g L⁻¹ (5.59 mol L⁻¹). For 2D development we also used the racemic mixture *S,R*-(\pm)-mandelic acid dissolved in ethanol–water 7:3 (v/v) in which the concentrations of the two antimers were 42.5 g L⁻¹ (2.80 mol L⁻¹) each.

2.2 Thin-Layer Chromatography (TLC)

Development of the chromatograms was carried out on commercial chromatographic glass plates precoated with 0.25 mm thick silica gel layers (20 cm \times 20 cm; manufactured by Merck; #1.05715). Before development, all plates were predeveloped in methanol–water 9:1 (v/v), to wash out any possible impurities adsorbed on the solid silica gel layer during plate storage, then dried at ambient temperature for 3 h. Then the plates were impregnated by dipping them for 2 s in a 5.01×10^{-2} mol L⁻¹ aqueous solution of Cu(CH₃COO)₂ (analytical purity grade, manufactured by POCh).

2.2.1 α -Hydroxybutyric Acids

Thin-layer chromatographic development of α -hydroxybutyric acids was performed at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. For both 1D and 2D chromatography dioxane–water 9:1 (v/v) was used as mobile phase.

The antimer samples of α -hydroxybutyric acids were applied to the chromatographic plates by use of a Desaga (Heidelberg, Germany) AS 30 automatic applicator. For 1D development, 3- μ L volumes of the samples were applied 1 cm above the lower edge of the plate, eight samples per plate, 2 cm apart (the first four bands were of the *S* antimer followed by four bands of the *R* antimer). The development distance was 8.5 cm and the plates were then dried for 3 h at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Finally, each lane was densitometrically scanned in the direction of development. This experiment was performed for 16 days and the chromatograms of the gradually ageing α -hydroxybutyric acid solutions were

developed at one-day intervals. High-performance liquid chromatographic (HPLC) evidence was obtained to prove that no structural degradation or condensation of the α -hydroxybutyric acids antimers occurred during the course of the storage period.

Densitograms were acquired by use of a (Desaga) CD 60 densitometer equipped with Windows-compatible ProQuant data-acquisition and processing software. For scanning, the wavelength 326 nm was selected from the mercury lamp and the geometry of the scanning beam was 0.1 mm \times 1.0 mm. The R_f values of the analytes in 1D development were calculated from their respective concentration profiles.

For 2D development one sample (3 μ L) of the α -hydroxybutyric acid solution was applied at the bottom corner of the plate and the plate was then developed in the first direction to a distance of 8.5 cm. Solutions of *S*-(+), *R*-(-), and *S,R*-(\pm)- α -hydroxybutyric acid were developed, each on a separate plate. The plates were then dried for 3 h at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and developed again in the second dimension, perpendicular to the first, to a distance of 8.5 cm. The plates were ultimately dried for 3 h at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and densitometrically scanned in the direction of the second development by use of 30 parallel scans 1 mm from each other. Scanning conditions were the same as described for 1D development. UV spectra of the separated α -hydroxybutyric acid antimers were acquired in situ, for this purpose using the deuterium lamp. Each 1D and 2D thin-layer chromatographic experiment was repeated three times.

2.2.2 Mandelic Acid

The experiment with mandelic acid was analogous to that performed with α -hydroxybutyric acid in this sense that the samples of mandelic acid antimers were applied on to the chromatographic plates by use of an automatic applicator, and the chromatograms were developed in 1D and 2D modes, as described in Section 2.2.1. The qualitative and quantitative composition of the mobile phases were also identical, as were the methods used for scanning the 1D and 2D chromatograms. Again HPLC evidence was obtained to prove that no structural degradation or condensation of the mandelic acid antimers occurred during storage.

For 1D development of mandelic acid, 1.5- μ L volumes were applied to the adsorbent surface 1 cm above the lower edge of the plate, 2 cm from each other (the first four bands were of the *S* antimer, followed by four bands of the *R* antimer). This experiment was performed for 12 days and chromatograms of the gradually ageing mandelic acid samples were developed at one-day intervals.

For 2D development one sample of mandelic acid solution (3- μ L) was applied to the bottom corner of the plate and the developing and scanning procedures were analogous with those described for α -hydroxybutyric acid.

Concentration profiles of the mandelic acid samples chromatographed by 1D development were scanned with UV light at 305 nm from the mercury lamp; the beam geometry was 0.1 mm \times 3.0 mm. Scanning of the chromatograms obtained from 2D development was performed at the same wavelength but this time the beam geometry was 0.1 mm \times 1.0 mm. UV spectra of the mandelic acid antimers separated by 2D development were acquired in situ by use of the deuterium lamp. Again, all 1D and 2D thin-layer chromatographic experiments were repeated three times.

2.3 Polarimetry

Measurements of the specific rotation ($[\alpha]_D$) of all the samples were performed by use of a Polamat A model polarimeter (Carl Zeiss, Jena, Germany). The cell length and volume were 1 dm and 1 mL, respectively. The specific rotation of the samples was calculated by use of the equation:

$$[\alpha]_D = 100\alpha/cd \quad (2)$$

where α is the measured rotation angle (in angle degrees), D is the wavelength (589 nm), c denotes the concentration of the investigated compound in g 100 mL⁻¹ solution, and d is the optical pathlength in dm.

2.3.1 α -Hydroxybutyric Acid

Polarimetric measurements of specific rotation ($[\alpha]_D$) for each α -hydroxybutyric acid antimer were performed in two separate experiments. In experiment 1, solutions of α -hydroxybutyric acid in ethanol–water 7:3 (v/v) were stored at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ for 9 days (*S* enantiomer) or for 13 days (*R* enantiomer) and measurements were made for several hours a day at 15-min intervals.

In experiment 2, the specific rotation ($[\alpha]_D$) of two series of the freshly prepared α -hydroxybutyric acid solutions in ethanol–water 7:3 (v/v) was measured at 15-min intervals for 6 h, separately at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and $9 \pm 2^\circ\text{C}$.

A literature survey [16–19] revealed striking variety in the specific rotation ($[\alpha]_D$) values reported by different authors. For the *S* antimer the $[\alpha]_D$ values were in the range -6.8 to 2.3° in water and from -4.4° to -3.8° in ethanol. For the *R* antimer, reported $[\alpha]_D$ values were in the range 2.5° to 6.0° . It is noteworthy that all the reference data were for the temperature 22°C (or approx.).

2.3.2 Mandelic Acid

By analogy with α -hydroxybutyric acid, polarimetric measurements of specific rotation ($[\alpha]_D$) for each mandelic acid antimer were performed in two separate experiments. In experiment 1, solutions of mandelic acid in ethanol–water 7:3 (v/v) were stored at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ for 32 days (*S* enantiomer) or for 26 days (*R* enantiomer), and measurements were made for periods of several hours per day at 15-min intervals.

In experiment 2, the specific rotation ($[\alpha]_D$) of two series of the freshly prepared mandelic acid solutions in ethanol–water 7:3 (v/v) was measured at 15-min intervals for 6 h, separately at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and $9 \pm 2^\circ\text{C}$.

As reported elsewhere [16, 20, 21], $[\alpha]_D$ for the *S* antimer is 156° in water and 151.5° in ethanol. The $[\alpha]_D$ value for *R*-(-)-mandelic acid is -154.2° in water [20], -153.5 in ethanol [21], and -155.0° in 95% in aqueous ethanol [22] (these results are for solutions kept at ambient temperature).

3 Results and Discussion

3.1 Thin-Layer Chromatography (TLC)

After a thorough survey of the available literature, as far as we are aware the results presented in this section are the first attempts at separation of the enantiomers of α -hydroxybutyric

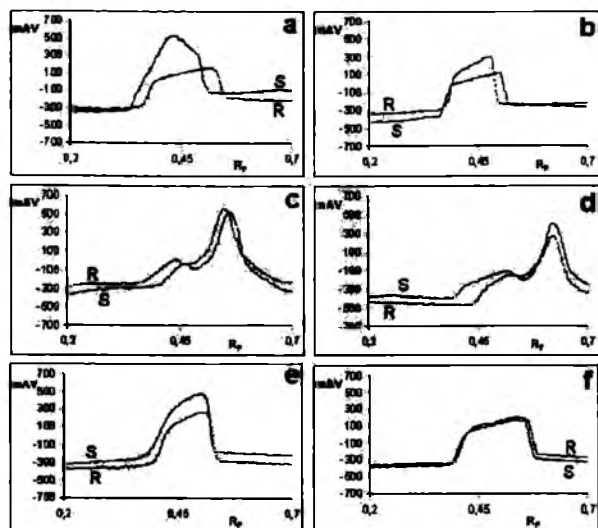


Figure 3

Sequence of densitometric concentration profiles (snapshots) for *S* and *R*- α -hydroxybutyric acid solutions in ethanol–water 7:3 (v/v) after storage at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ for (a) 0 days, (b) 2 days, (c) 6 days, (d) 9 days, (e) 13 days, and (f) 15 days.

acid and mandelic acid by TLC (although enantiomer separation alone was not an ultimate objective of this study).

3.1.1 α -Hydroxybutyric Acid

The ultimate objective of separation of *S* and *R*- α -hydroxybutyric acid was to check whether these two optically pure enantiomers can undergo spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion when dissolved in 7:3 (v/v) ethanol–water. To this effect, the stored *S* and *R*- α -hydroxybutyric acid solutions were chromatographed in 1D mode at one-day intervals and the chromatograms obtained were scanned densitometrically.

Empirical evidence of the oscillatory chiral conversion with α -hydroxybutyric acid antimers is demonstrated in Figure 3, which shows selected snapshots of the concentration profiles of the *S* and *R* antimers on the first day of the experiment and after 2, 6, 9, 13, and 15 days of storage at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. These snapshots show that the concentration profiles of the investigated compounds steadily change their shape and position on the scale of R_F values, which is the best proof of their chiral lability and of the oscillatory chiral conversion running all the time. Even on the first day of the experiment, the concentration profiles of the two antimers partially overlap, yet they are broad enough to suggest rapid chiral conversion and the presence of the two antimers under the peak envelope. Luckily enough, on the first day (and also on day 2), the maxima of these two bands do not overlap and, hence, it can be assumed that the *R* antimer migrates higher than the *S* antimer (their respective R_F values on the first day of the experiment are 0.52 and 0.44). On days 13 and 15, the concentration profiles of the two antimers almost fully overlap and on days 6 and 9, partial separation of the enantiomers is achieved with the two samples. The close position of the bands belonging to the two antimers is because of so-called lateral interactions, i.e. intermolecular *S*...*R* interactions through hydrogen bonds, which make separation of the enantiomers of carboxylic acids a challenging task.

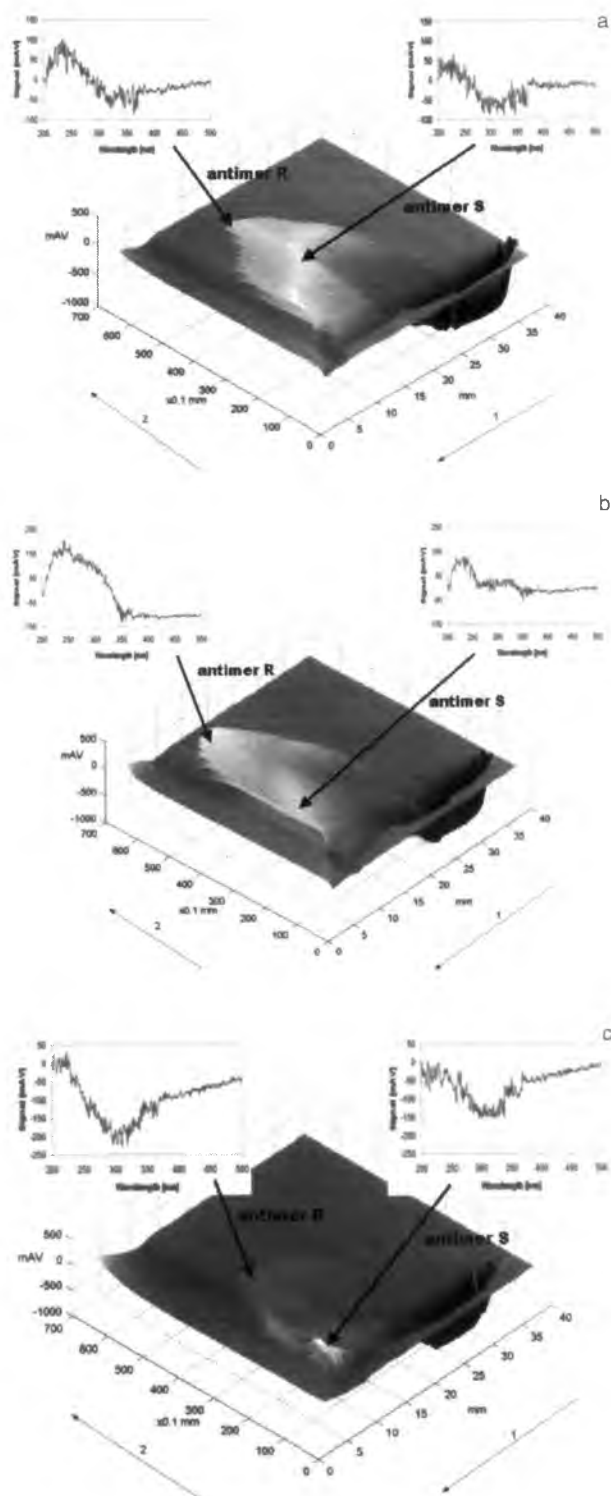


Figure 4

Three-dimensional representation of the chromatograms of α -hydroxybutyric acid after 2D development of (a) *S*- α -hydroxybutyric acid solution stored for 16 days, (b) *R*- α -hydroxybutyric acid solution stored for 16 days, and (c) *S,R*- α -hydroxybutyric acid solution stored for 5 days. All solutions were in ethanol–water 7:3 (v/v) and stored at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. The 3D pictures were based on densitometric scans of the separated pairs of α -hydroxybutyric acid antimers taken at 1-mm intervals.

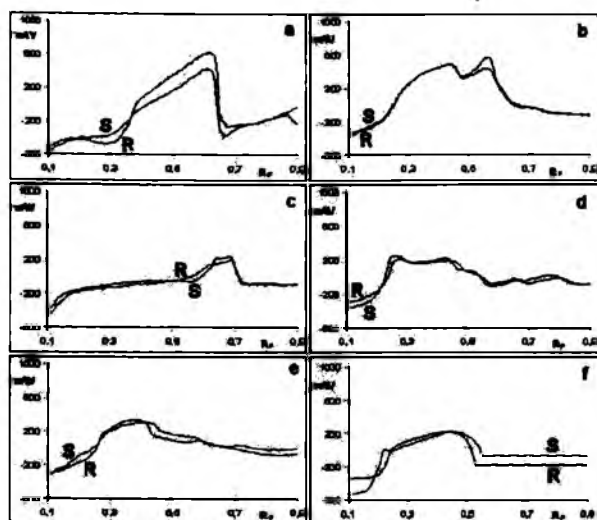


Figure 5

Sequence of densitometric concentration profiles (snapshots) for *S*-(+)- and *R*-(-)-mandelic acid solutions in ethanol–water 7:3 (v/v) after storage at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ for (a) 0 days, (b) 2 days, (c) 4 days, (d) 7 days, (e) 9 days, and (f) 11 days.

It is virtually impossible to conclude from chromatographic evidence alone when the oscillatory chiral conversion really starts – whether it commences immediately after dissolution of the acid sample in ethanol–water or is triggered by intermolecular interactions of acid molecules with silica gel present in the TLC system or is influenced by each of these factors.

Encouraged by an occasional partial separation of the enantiomers of the α -hydroxybutyric acid antimers by 1D development (as shown in Figures 3c and 3d), we decided to try 2D development also. To this effect, we chromatographed samples of *S*- α -hydroxybutyric acid and *R*- α -hydroxybutyric acid solutions (each stored for 16 days), and a sample of *S,R*- α -hydroxybutyric acid (stored for five days). The 3D densitograms obtained from the successful enantiomer separations, with the respective UV spectra acquired in situ from the maximum of each separated enantiomer, are shown in Figure 4. In each of these 3D chromatograms the band intensity of the UV spectrum attributed to the *R* enantiomer was higher than that attributed to the *S* enantiomer, which suggested a relatively greater amount of the *R* enantiomer than the *S* enantiomer in each sample and, indirectly, slower chiral conversion of the *R* enantiomer (this observation was confirmed by the results from polarimetry, discussed in Section 3.2.1).

3.1.2 Mandelic Acid

In this work also, similar to the enantiomer separation experiment with *S* and *R*- α -hydroxybutyric acid, the ultimate objective was to check whether *S*-(+)- and *R*-(-)-mandelic acid undergo spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion when dissolved in ethanol–water 7:3 (v/v). To this effect, stored mandelic acid samples were chromatographed at one-day intervals by 1D development and the chromatograms obtained were scanned densitometrically.

Empirical evidence of the oscillatory chiral conversion of mandelic acid antimers is illustrated in Figure 5, which shows

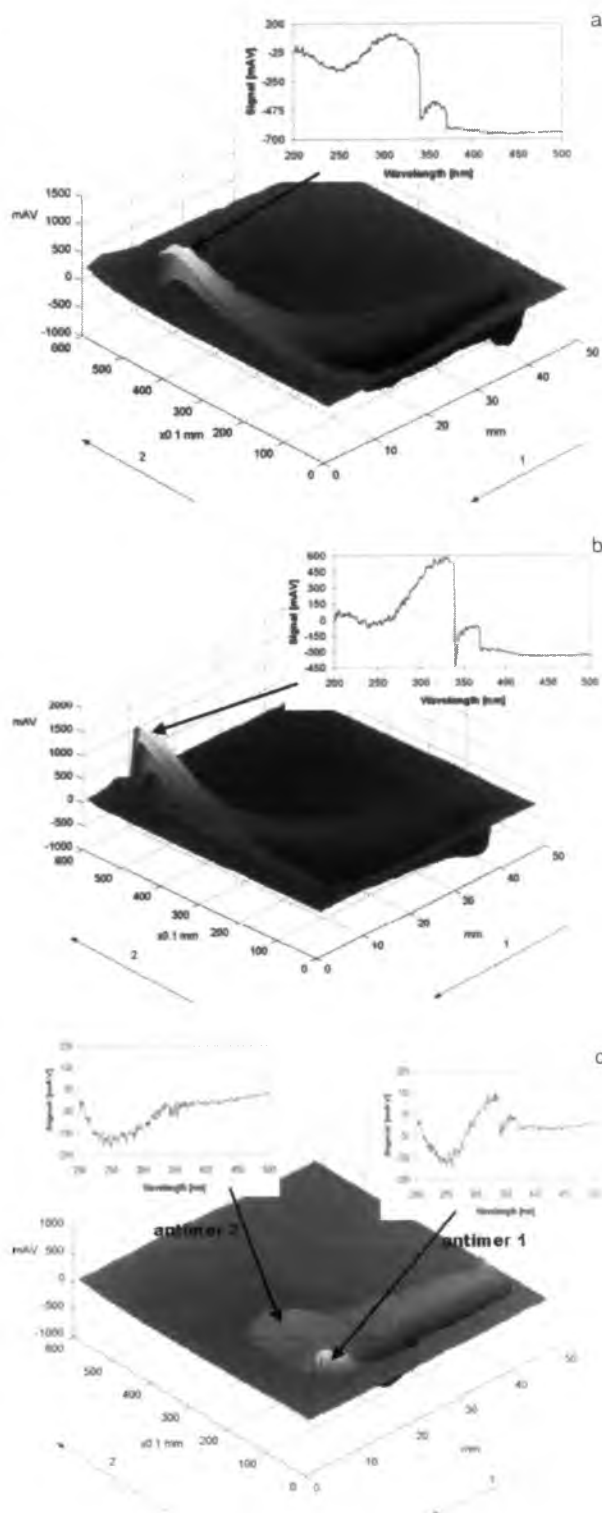


Figure 6

Three-dimensional representation of the chromatograms of mandelic acid after 2D development of the a) *S*-(+)-mandelic acid solution stored for 12 days, (b) *R*-(-)-mandelic acid solution stored for 12 days, and (c) *S,R*(±)-mandelic acid solution stored for 2 days. All solutions were in ethanol–water 7:3 (v/v) and stored at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. The 3D pictures were based on densitometric scans taken at 1-mm intervals.

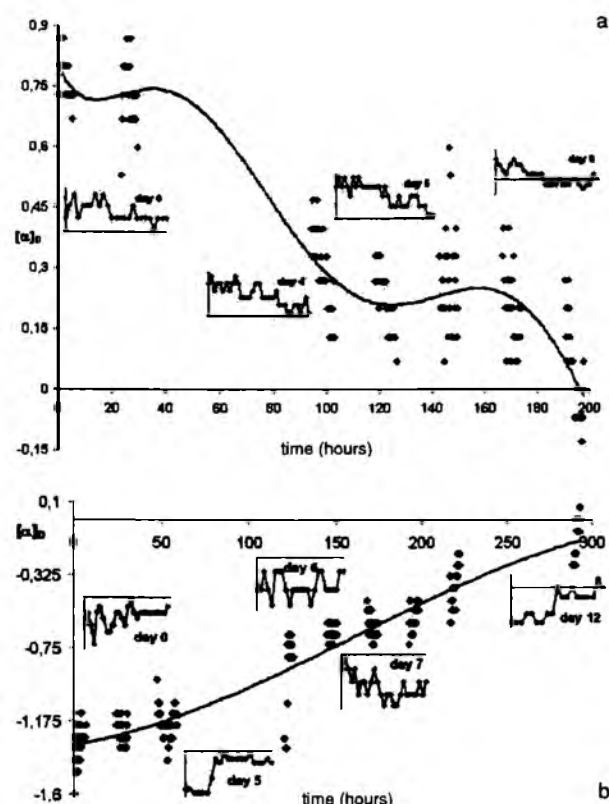


Figure 7

Oscillatory changes of specific rotation, $[\alpha]_D$, as a function of sample storage time for (a) *S*- α -hydroxybutyric acid and (b) *R*- α -hydroxybutyric acid dissolved in ethanol–water 7:3 (v/v) and kept at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Windows illustrate oscillatory changes on selected measurement days and the solid line illustrates the general oscillatory trend over the entire storage period.

selected snapshots of the concentration profiles of the *S* and *R* antimers on the first day of the experiment and after storage for 2, 4, 7, 9, and 11 days at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Similar to the previous case, these snapshots for mandelic acid show concentration profiles of the compounds steadily changing their shape and position on the scale of R_F values; this is proof of chiral lability of the compounds and of the permanently running oscillatory chiral conversion. Unlike in the previous case, even on the first day of the experiment, concentration profiles of the two mandelic acid antimers were almost identical, which shows the oscillation period is even shorter for these two compounds (resulting in very rapid racemization) than for the α -hydroxybutyric acids. Again, these concentration profiles are broad enough to suggest the presence of the two antimers under the band and to demonstrate the negative impact of lateral interactions on the separation of the enantiomers of carboxylic acids. Even, if 1D development of the mandelic acid samples occasionally resulted in partial enantiomer separation (as shown, e.g., in Figures 5b and 5d) it was not possible to ascribe the plus and the minus signs to the two resolved maxima.

Again, it is virtually impossible to conclude from chromatographic evidence alone when the oscillatory chiral conversion of the investigated *S*(+) and *R*(-)–mandelic acids starts, and whether it occurs because of dissolution of the acid samples in

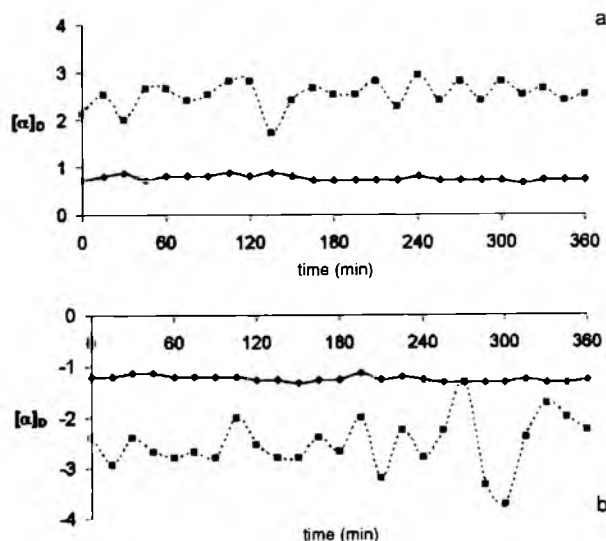


Figure 8

Comparison of the oscillations of the specific rotation, $[\alpha]_D$, of *S*- α -hydroxybutyric acid and (b) *R*- α -hydroxybutyric acid dissolved in ethanol–water 7:3 (v/v) and stored for 360 min at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ (solid line) and $9 \pm 2^\circ\text{C}$ (dashed line).

ethanol–water, intermolecular interactions of acid molecules with the components of the TLC system, or to a combination of these two factors.

Encouraged by the occasional partial separation of the enantiomers of mandelic acid by 1D development (Figures 5b and 5d), we also used 2D development. To this effect we chromatographed samples of *S*(+) and *R*(-)–mandelic acid solutions (each stored for 12 days) and a sample of *S,R*(±)–mandelic acid solution (stored for 2 days). The results obtained, in the form of 3D chromatograms (with the in situ recorded UV spectra) are given in Figure 6. The chromatograms shown in Figures 6a and 6b illustrate the lack of separation of the enantiomers of *S*(+) and *R*(-)–mandelic acid. Evidently, chiral conversion of the mandelic acid antimers is so rapid and lateral *S*...*R* interactions so effective that – similar to 1D development – in this case also separation of the two antimers is not always possible. In Figure 6c, successful separation of the enantiomers of *S,R*(±)–mandelic acid is shown. In this case – similar to separation of the enantiomers of α -hydroxybutyric acid – the fraction having the lower R_F value is more abundant, but there is no legitimate means of attributing the plus or minus sign to it.

3.2 Polarimetry

Although polarimetry is the primary analytical tool used to investigate chirality, with its aid we are unable to distinguish between the change of specific rotation, $[\alpha]_D$, because of oscillatory chiral conversion and that resulting from self-association of the molecules to form supramolecular aggregates with a dynamic composition and changing steric arrangement. Hence, the results presented in the sections below should be viewed as a possible joint effect of chiral conversion (chemical process) and formation of dynamic supramolecular aggregates (physical process). However, the long-term oscillatory changes of specific rotation recorded in this study (and resulting in $[\alpha]_D \approx 0$) are

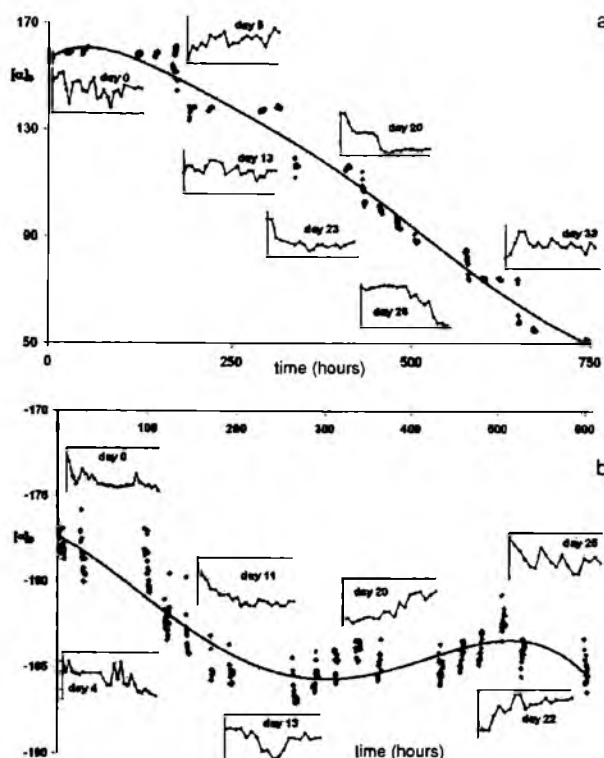


Figure 9

Oscillatory changes of the specific rotation, $[\alpha]_D$, as a function of sample storage time for (a) S-(+)-mandelic acid and (b) R-(-)-mandelic acid dissolved in ethanol–water 7:3 (v/v) and kept at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Windows illustrate oscillatory changes on selected measurement days and the solid line illustrates the general oscillatory trend over the entire storage period.

unequivocally attributable to chiral conversion and, more specifically, to racemization (or scalemization) of the samples.

3.2.1 α -Hydroxybutyric Acid

Investigation of the specific rotation ($[\alpha]_D$) change for α -hydroxybutyric acid enantiomers dissolved in ethanol–water 7:3 (v/v), was carried out in experiments 1 and 2 described in Section 2.3.1.

From the results of experiment 1 it was apparent that during long-term storage the numerical values of $[\alpha]_D$ for the two antimers tended to zero in an oscillatory manner (Figure 7). Thus a conclusion can be drawn that during the storage period, two α -hydroxybutyric acid antimers underwent gradual racemization. This process proved, however, more dynamic with S enantiomer than with its R antimer (Figures 7a and 7b). This difference can result from unequal trace amounts of a contaminating antimer in the α -hydroxybutyric acid samples investigated (both of analytical purity grade), as explained in the theoretical model introduced elsewhere [10].

The results of experiment 2 are given as plots in Figure 8. For each α -hydroxybutyric acid antimer, the oscillatory changes of the specific rotation value are far more pronounced at $9 \pm 2^\circ\text{C}$ than at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. This is certainly because of increased (and probably anisotropic) viscosity of the solutions at the lower temperature and, as a consequence, lower molar diffusion coefficient

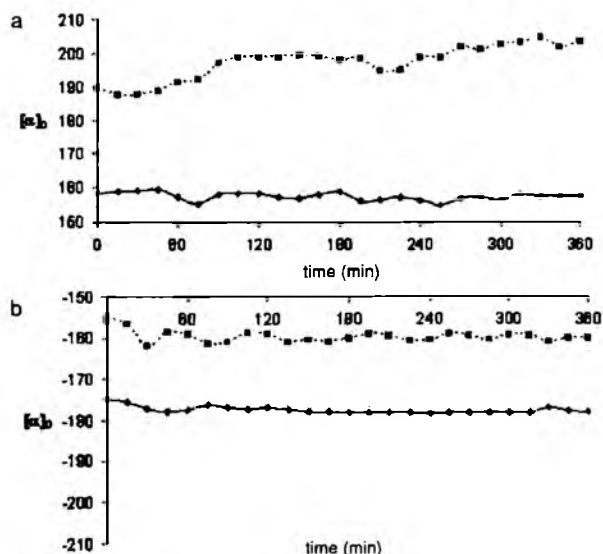


Figure 10

Comparison of the oscillations of the specific rotation, $[\alpha]_D$, of S-(+)-mandelic acid and (b) R-(-)-mandelic acid dissolved in ethanol–water 7:3 (v/v) and stored for 360 min at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ (solid line) and $9 \pm 2^\circ\text{C}$ (dashed line).

icients of the two α -hydroxybutyric acids in the respective solutions. It is also noteworthy that the amplitude of oscillations for the R enantiomer is perceptibly higher than for its S counterpart (Figures 8a and 8b).

3.2.2 Mandelic Acid

Investigation of the specific rotation $[\alpha]_D$ change for the enantiomers of mandelic acid dissolved in ethanol–water 7:3 (v/v) was carried out in experiments 1 and 2, described in Section 2.3.2.

From the results of experiment 1 it was apparent that during long-term storage the numerical values of $[\alpha]_D$ for the two antimers were undergoing steady oscillatory change (Figure 9). These numerical values tended to zero for S-(+)-mandelic acid only, however (Figure 9a). For R-(-)-mandelic acid, during the whole period investigated, the numerical values of $[\alpha]_D$ were oscillating in the range $-180 \pm 10^\circ$. Again, this difference most probably results from a difference in the amounts of an antipode contaminating a given mandelic acid sample, as explained elsewhere [10].

The results from experiment 2 are presented in Figure 10. The oscillatory changes of the specific rotation for both mandelic acid antimers are more pronounced at $9 \pm 2^\circ\text{C}$ than at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Again, this is because of increased (and probably anisotropically distributed) viscosity of the solutions at the lower temperature and, as a consequence, the reduced molar diffusion coefficient of the two α -hydroxybutyric acids. In contrast with the α -hydroxybutyric acid antimers, the oscillation amplitudes for both mandelic acid antimers are of similar intensity (Figures 8a and 8b).

4 Conclusions

The results obtained in this study lead to the following conclusions:

1. Thin-layer chromatography (combined with polarimetry as a supporting instrumental technique) is well suited to discovery and monitoring of the oscillatory chiral conversion of carboxylic acids.
2. The spontaneous oscillatory in-vitro chiral conversion occurs not only with α -substituted chiral carboxylic acids having three carbon atoms per molecule (i.e. those derived from propionic acid) but also with α -substituted chiral carboxylic acids having two and four carbon atoms per molecule (i.e. those derived, respectively, from acetic and butyric acids).

Acknowledgment

The work of two of the authors (D.K. and M.G.) was partially supported by PhD scholarships granted to them in 2008 within the framework of the "University as a Partner of the Economy Based on Science" (UPGOW) project, subsidized by the European Social Fund (EFS) of the European Union.

References

- [1] M.J. Thomason, W. Rhys-Williams, A.W. Lloyd, and G.W. Hanlon, *J. Appl. Microbiol.* **85** (1998) 155–163.
- [2] F. Jamali, R. Lovlin, and G. Aberg, *Chirality* **9** (1997) 29–31.
- [3] A.J. Hutt, A. Kooloobandi, and G.W. Hanlon, *Chirality* **5** (1993) 596–601.
- [4] C. Wolf, *Chem. Soc. Rev.* **34** (2005) 595–608.
- [5] C. Wolf, *Dynamic Stereochemistry of Chiral Compounds. Principles and Applications*. RSC Publishing, Cambridge, 2008.
- [6] M. Sajewicz, R. Piętko, A. Pieniak, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.* **15** (2005) 131–149.
- [7] M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, and T. Kowalska, *J. Planar Chromatogr.* **21** (2008) 43–47.
- [8] M. Sajewicz, D. Kronenbach, D. Staszek, M. Wróbel, G. Grygierczyk, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **31** (2008) 2006–2018.
- [9] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.* **20** (2008) 209–225.
- [10] M. Sajewicz, M. Gontarska, Ł. Wojtal, D. Kronenbach, M. Leda, I.R. Epstein, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **31** (2008) 1986–2005.
- [11] M. Sajewicz, R. Wrzałik, M. Gontarska, D. Kronenbach, M. Leda, I.R. Epstein, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **32** (2009) 1359–1372.
- [12] E. Peacock-Lopez, D.B. Radov, and C.S. Flesner, *Biophys. Chem.* **65** (1997) 171–178.
- [13] L.L. Tsai, G.R. Hutchinson, and E. Peacock-Lopez, *J. Chem. Phys.* **113** (2000) 2003–2006.
- [14] Y. Xie, H. Liu, and J. Chen, *Int. J. Pharm.* **196** (2000) 21–26.
- [15] M. Sajewicz, E. John, D. Kronenbach, M. Gontarska, M. Wróbel, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.* **21** (2009) 39–55.
- [16] <http://www.crossfirebeilstein.com/>
- [17] P.A. Levene and H.L. Haller, *J. Biol. Chem.* **69** (1926) 165–173.
- [18] G. Just, C. Luthe, and P. Potvin, *Tetrahedron Lett.* **23** (1982) 2285–2288.
- [19] E.A. Jares-Erijman, A.I. Ingram, J.R. Carney, K.L. Rinehart, and R. Sakai, *J. Org. Chem.* **58** (1993) 4805–4808.
- [20] J. Schiffers, T. Rantanen, F. Schmidt, W. Bergmans, L. Zani, and C. Bolm, *J. Org. Chem.* **71** (2006) 2320–2331.
- [21] P.L. Polavarapu, L.P. Fontana, and H.E. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **108** (1986) 94–99.
- [22] C.P. Whitman, J.G. Craig, and G.L. Kenyon, *Tetrahedron.* **41** (1985) 1183–1192.

Ms received: November 26, 2008

Accepted: March 3, 2009

On the Spontaneous Condensation of Selected Hydroxy Acids

M. SAJEWICZ, M. MATLENGIEWICZ, D. KRONENBACH, M. GONTARSKA AND
T. KOWALSKA

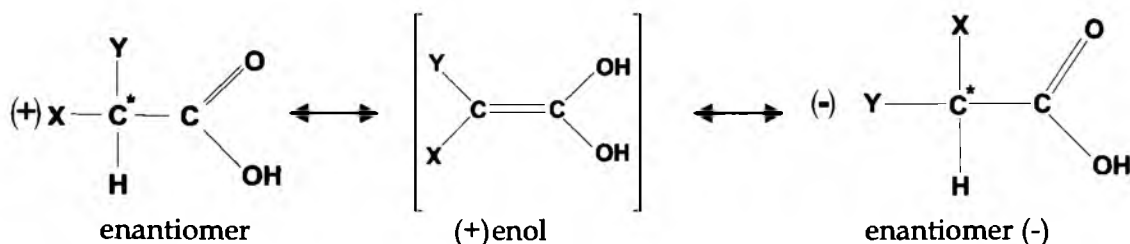
Institute of Chemistry, Silesian University, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland
E-mail: kowalska@us.edu.pl

Summary. In a previous study we provided thin-layer chromatographic, polarimetric, and other experimental evidence that phenylglycine can undergo easy spontaneous peptidization in abiotic aqueous media. From our unpublished results it is apparent that this behaviour is also characteristic of some amino acids (e.g., alanine and phenylalanine). It seems highly probable that this abiotic peptidization of amino acids dissolved in aqueous media is directly linked to their ability to undergo spontaneous oscillatory chiral conversion. In our earlier research it was also shown that spontaneous oscillatory chiral conversion was characteristic not only of amino acids but also of several other classes of carboxylic acid, including profen drugs and hydroxy acids. We therefore decided to check whether selected chiral hydroxy acids – lactic acid and mandelic acid – previously recognized for their ability to undergo spontaneous oscillatory chiral conversion, could also furnish the respective polyacids. Condensation of hydroxy acids can be viewed as a reaction fully analogous with peptidization of amino acids and, hence, it seemed to us highly probable that it also can be triggered by oscillatory chiral conversion. In our study, we used thin-layer chromatography and ^{13}C NMR spectroscopy to check whether formation of polylactic acid and polymandelic acid occurred in stored solutions of lactic and mandelic acids. By means of polarimetry with continuous recording we provided experimental evidence that all three hydroxy acids investigated (i.e. L-(+)-lactic acid, S-(+)-mandelic acid, and R-(–)-mandelic acid) undergo continuous chiral conversion. From the thin-layer chromatographic results obtained it was apparent that – similar to the spontaneous and instantaneous peptidization of amino acids – the hydroxy acids investigated also undergo easy condensation to form the respective polyacids. ^{13}C NMR spectroscopy provided additional experimental confirmation of this.

Key Words: lactic acid, polylactic acid, mandelic acid, polymandelic acid, oscillatory chiral conversion, TLC, ^{13}C NMR spectroscopy

Introduction

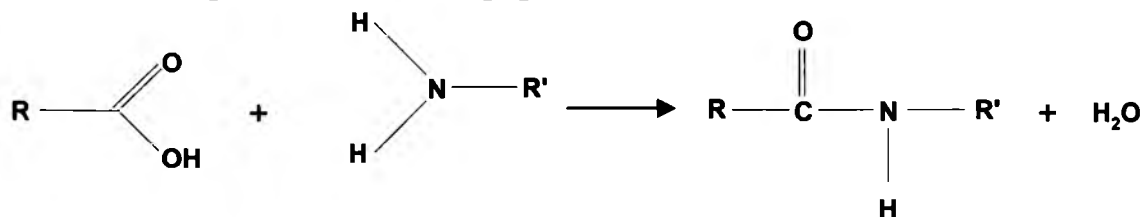
In our earlier study [1] we observed a striking example of an α -amino acid (phenylglycine) able to undergo easy and spontaneous peptidization in an abiotic aqueous medium. To us it seemed intuitively understandable that the spontaneous peptidization of phenylglycine is triggered by its ability to undergo spontaneous oscillatory chiral conversion in an abiotic liquid system, as illustrated by the scheme given below:



where $\text{X} = \text{NH}_2$ and $\text{Y} = \text{Ph}$.

We have also shown that the oscillatory chiral conversion of carboxylic acids dissolved in abiotic aqueous media is characteristic of a wide range of compound classes (e.g., profen drugs, amino acids, and hydroxy acids) and, consequently, that it can be viewed as a fairly general process [2-7].

Peptidization of phenylglycine (and of other amino acids) is a condensation reaction which consists in formation of peptide bonds accompanied by the elimination of water molecules, as illustrated by the simple scheme below showing formation of a dipeptide:



Because hydroxy acids can undergo spontaneous oscillatory chiral conversion fully analogous with that observed for amino acids, we were curious to discover whether this property also triggers spontaneous and easy condensation of these compounds. We therefore dissolved lactic and mandelic acids in selected low-molecular-weight solvents, stored the solutions, and then checked them for the presence of the respective polyacids by means of thin-layer chromatography (TLC) and ^{13}C NMR spectroscopy. Polarimetric evidence showing oscillatory changes of the specific rotation of solutions of all the compounds investigated (i.e. L-lactic acid, R-mandelic acid, and S-mandelic acid) in 70% aqueous ethanol was also obtained.

Experimental

Chemicals and Reagents

L-(+)-lactic acid was from Fluka (Buchs, Switzerland; #69771), and S-(+) and R-(-)-mandelic acids were from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA; #M2004 and #154210, respectively). The structural formula of L-(+)-lactic acid is given in Fig. 1, and those of S-(+) and R-(-)-mandelic acids are given in Figs 2a, b.

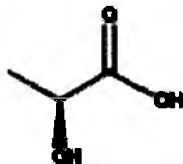


Fig. 1. The chemical structure of L-lactic acid

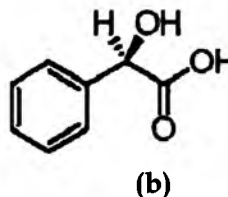
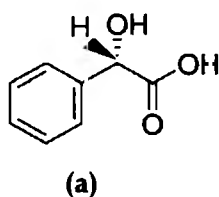


Fig. 2. The chemical structures of (a) S-(+)-mandelic acid and (b) R-(-)-mandelic acid

Copper(II) acetate was analytical grade from POCh (Gliwice, Poland).

Thin-Layer Chromatography (TLC)

Thin-layer chromatography was performed on commercial 20 cm × 20 cm glass plates precoated with 0.25-mm layers of silica gel (Merck, Darmstadt, Germany; #1.05715). Before use the plates were developed with methanol-water 9:1 (*v/v*), to wash impurities from the adsorbent layer, then dried in air at ambient temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) for 3 h. The pre-developed, dried plates were impregnated by dipping for 2 s in an aqueous solution of $5.01 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ copper(II) acetate. Finally, the impregnated plates were dried for 1 h in a stream of warm air from a hair dryer.

TLC was performed on solutions of L-(+)-lactic acid (10 g L^{-1} ; $1.11 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$) and racemic (i.e. R,S-(±)) mandelic acid (10 g L^{-1} ; $6.57 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) in double-distilled water, 70% aqueous ethanol, and pure ethanol. The solutions (5 μL) were applied to the plates 2 cm apart, 1 cm above the lower edge, by use of a Desaga (Heidelberg, Germany) AS 30 autosampler. Nine samples of each acid were applied to each plate; the first

three were dissolved in water, the next three in 70% aqueous ethanol, and the last three in ethanol. One-dimensional development of the chromatograms to a distance of 8.5 cm, with dioxane–water 9:1 (*v/v*) as mobile phase, was performed at ambient temperature (22°C). The chromatograms were then dried at ambient temperature for 3 h. Finally, each chromatographic band was scanned densitometrically, in the direction of development, by use of a Desaga model CD 60 densitometer equipped with Windows-compatible ProQuant software. Concentration profiles were recorded in reflectance mode, by use of ultraviolet (UV) light from the mercury lamp, at 315 and 305 nm for L-(+)-lactic acid and R,S-(±)-mandelic acid, respectively. The dimensions of the rectangular scanning beam were 0.1 mm × 1.0 mm. Each chromatographic experiment was performed in triplicate.

¹³C NMR Spectroscopy

¹³C NMR spectra at 100 MHz were recorded on a Bruker Avance 400 NMR spectrometer. Solutions (10 mg mL⁻¹) of L-(+)-lactic and S-(+)-mandelic acids in pure ethanol were stored for ten days at 22°C then the ethanol was evaporated, the residues were dissolved in CDCl₃ (99.8%, Armar Chemicals, Switzerland), and tetramethylsilane (TMS) was added as internal reference. Approximately 7000 scans, with a time delay, *D1*, of 8 s between consecutive scans, were sufficient to obtain a good signal-to-noise ratio.

Polarimetry

The optical rotation of the samples at 22°C was measured by means of a Perkin-Elmer (Wellesley, MA, USA) model 341 precision polarimeter. Data were acquired continuously at 5-s intervals for two or more hours, depending on the compound studied. The wavelength used was 589 nm, which corresponds to the sodium D line. The specific rotation $[\alpha]_D$ of the samples was calculated by use of the equation:

$$[\alpha]_D = 100\alpha/cd$$

where *a* is for the measured rotation (in angle degrees), *D* is the wavelength (589 nm), *c* denotes the concentration of the compound in g 100 mL⁻¹ solution, and *d* is the optical path length in dm.

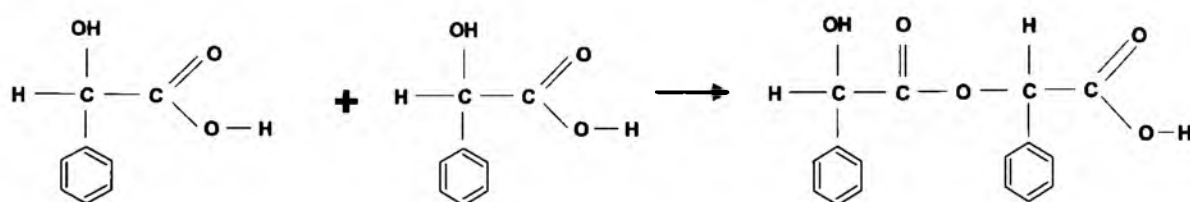
From the literature [8] it is known that the specific rotation of L-(+)-lactic acid at ambient temperature is 2.6°. We obtained an identical value for a freshly prepared solution of L-(+)-lactic acid. A literature survey, however,

revealed a striking variety of specific rotation ($[\alpha]_D$) values reported by different authors for the *S* and *R* antimers of mandelic acid. As reported in Refs 9–11, $[\alpha]_D$ for the *S* enantiomer is 156° in water and 151.5° in ethanol. Reported $[\alpha]_D$ values for *R*-(–)-mandelic acid are -154.2° in water [10], -153.5 in ethanol [11], and -155.0° in 95% aqueous ethanol [12] (these results are valid for solutions at ambient temperature).

Our polarimetric experiments were performed on solutions of L-(+)-lactic acid (50 g L^{-1} ; $5.55 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$) and *S*-(+) and *R*-(–)-mandelic acids (each 85 g L^{-1} ; 5.59 mol L^{-1}) in 70% aqueous ethanol.

Results and Discussion

One objective of this study was to amass convincing experimental evidence of spontaneous condensation of the chiral hydroxy acids similar to the spontaneous peptidization of phenylglycine, reported elsewhere [1]. A simple schematic diagram of such a condensation is that given below illustrating the formation of dimandelic acid.



In our opinion, the process of condensation of the hydroxy acids investigated might be triggered by their oscillatory chiral conversion, which is a non-linear process. To this effect, we performed continuous polarimetric recording of the optical rotation of L-(+)-lactic acid and *S*-(+) and *R*-(–)-mandelic acids and the calculated $[\alpha]_D$. The condensation products were detected by means of TLC and ^{13}C NMR spectroscopy. The experimental results obtained are presented in the forthcoming sections.

Polarimetry

Continuous measurement of $[\alpha]_D$ for L-(+)-lactic acid and *S*-(+) and *R*-(–)-mandelic acids is reported for the first time in this paper; the results obtained clearly show the dynamic oscillations of these values. Similar results, although recorded at 10 or 15-min intervals only, have already been presented elsewhere [7, 13].

From the results shown in Figs 3–5 it is apparent that L-(+)-lactic acid and *S*-(+) and *R*-(–)-mandelic acids undergo dynamic chiral conversion

when stored at 22°C as solutions in 70% aqueous ethanol. It seems highly probable that the oscillatory chiral conversion of these three hydroxy acids is an inevitable precondition which, during the enolization step, triggers condensation of the acids.

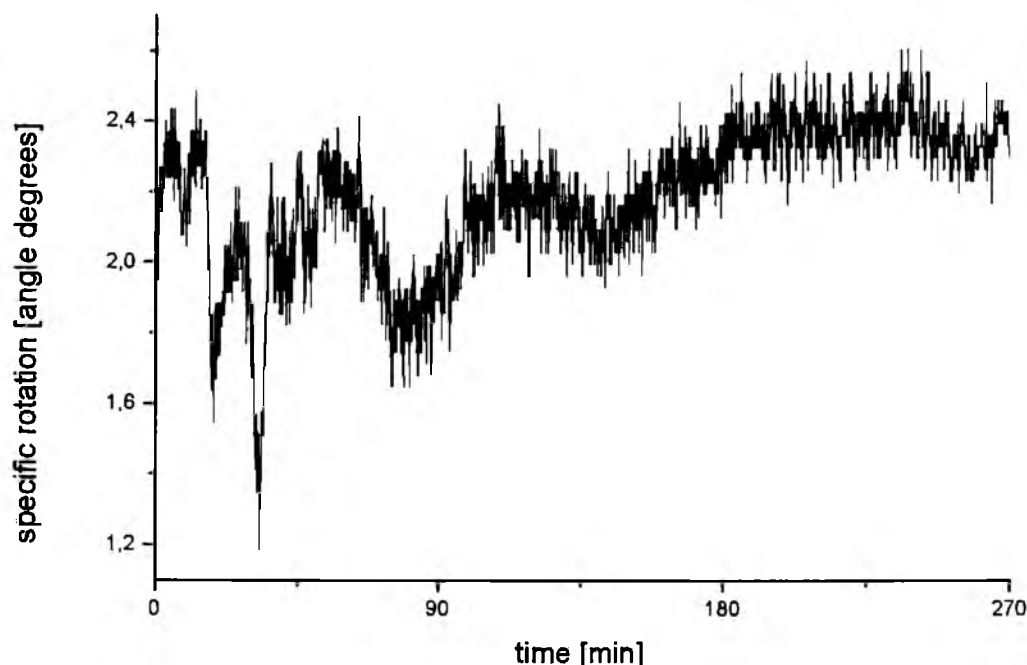


Fig. 3. Oscillatory changes of specific rotation, $[\alpha]_D$, as a function of sample storage time, for L-(+)-lactic acid dissolved in 70% aqueous ethanol and stored at 22°C

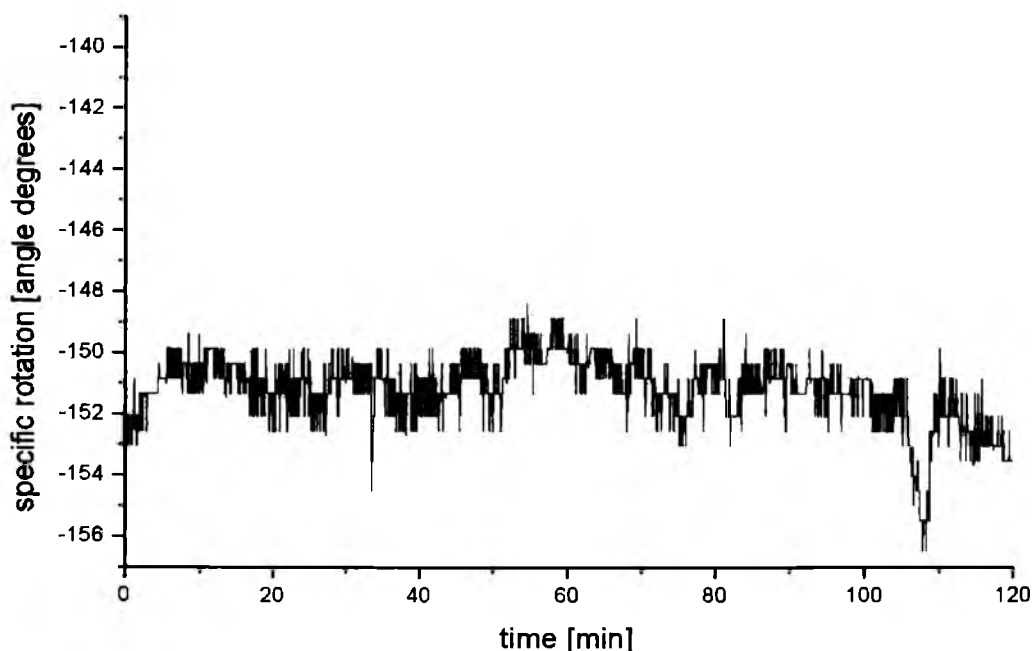


Fig. 4. Oscillatory changes of specific rotation, $[\alpha]_D$, as a function of sample storage time, for R-(-)-mandelic acid dissolved in 70% aqueous ethanol and stored at 22°C

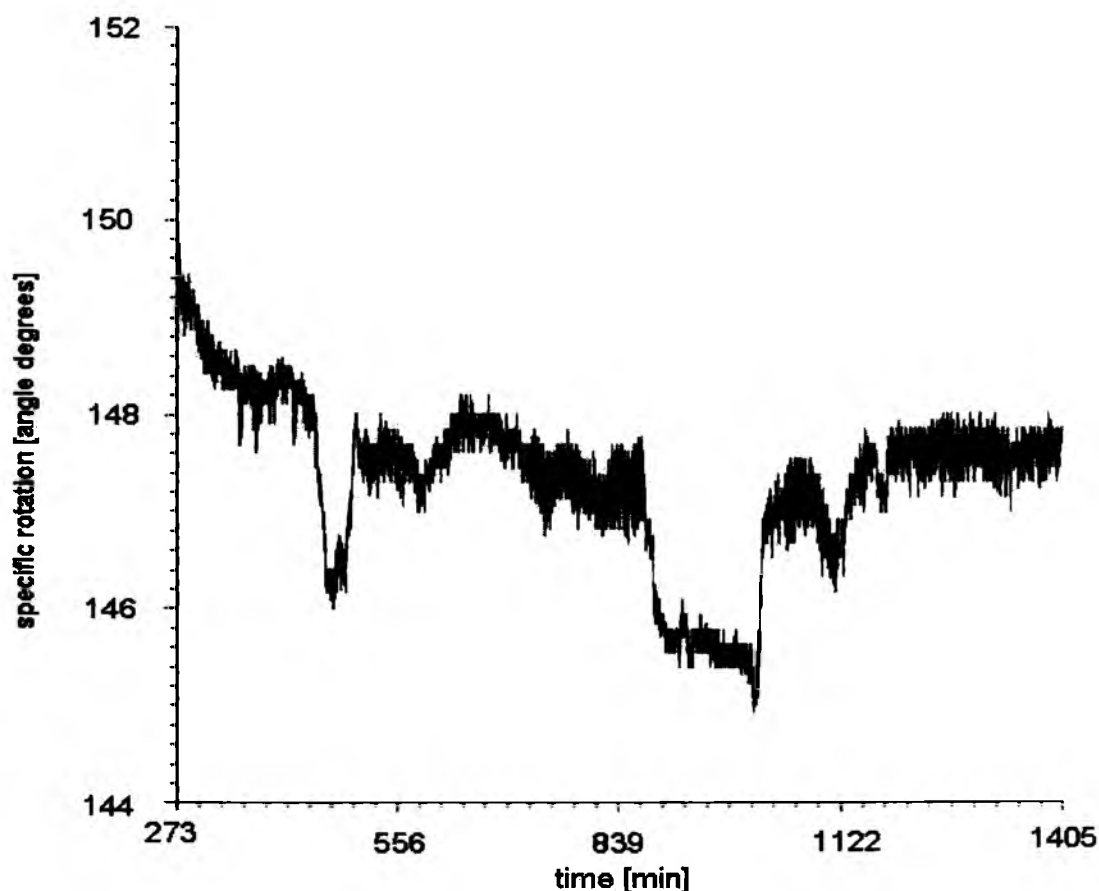


Fig. 5. Oscillatory changes of specific rotation, $[\alpha]_D$, as a function of sample storage time, for S-(+)-mandelic acid dissolved in 70% aqueous ethanol and stored at 22°C

Thin-Layer Chromatography (TLC)

In our earlier paper on the spontaneous rapid peptidization of phenylglycine in abiotic aqueous media [1], in the first instance we used TLC to reveal this striking phenomenon. We provided densitometric evidence showing that as a result of partial peptidization of the amino acid the peptide fraction remained at the origin of the chromatogram whereas the monomeric fraction moved along the chromatographic plate with the mobile phase. It seemed understandable that the immobility of the peptide fraction was because of the increased molecular weight of peptide units (compared with the monomeric amino acid) and also because of accumulation of polar functionality in each such unit. In this study we expected that condensation of the investigated hydroxy acids and formation of the respective polyacids could be demonstrated analogously.

To achieve this we dissolved L-(+)-lactic acid, S-(+)-mandelic acid, and R,S-(±)-mandelic acid in each of three different solvents, i.e., in pure water, 70% aqueous ethanol, and pure ethanol, left the solutions for a few days,

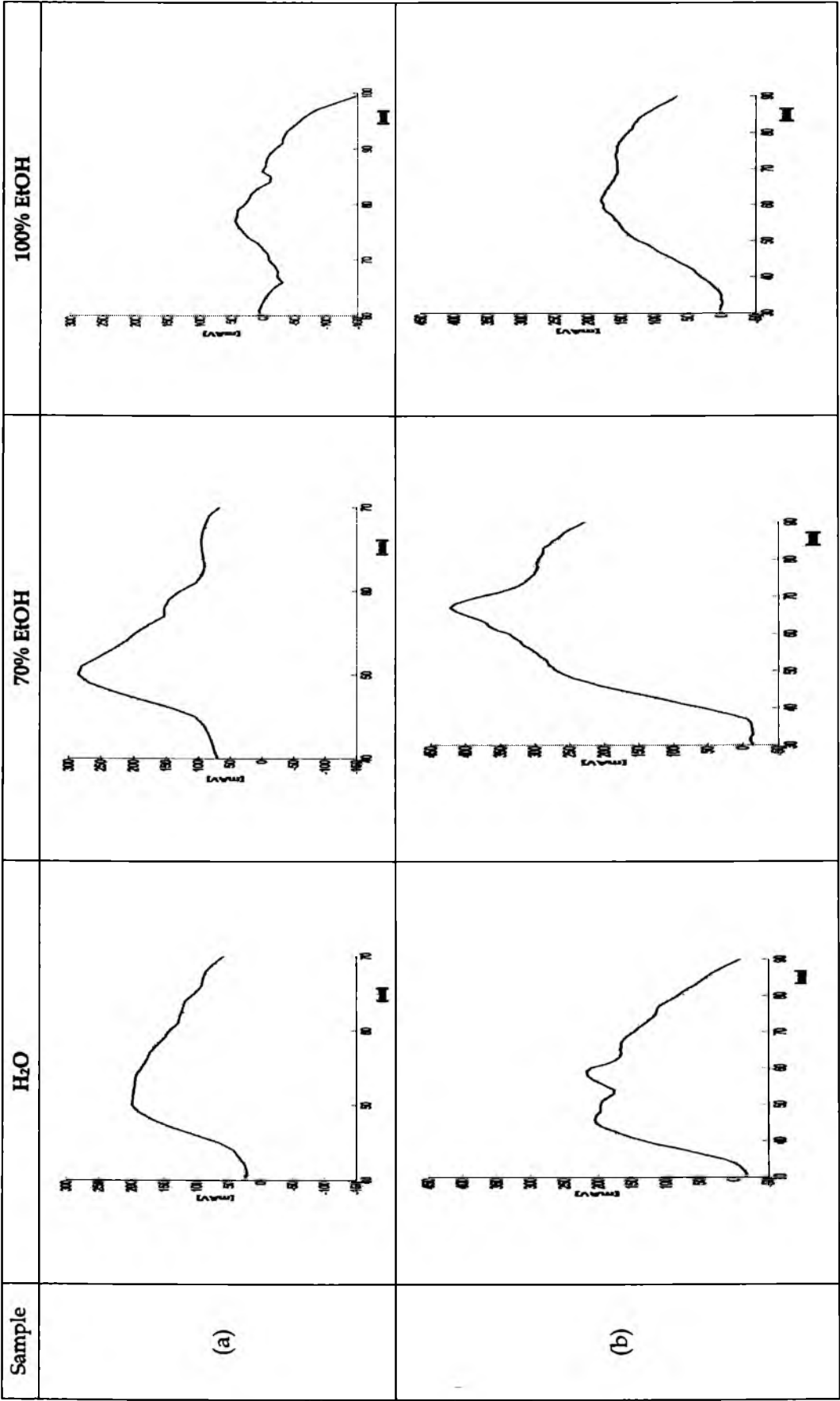


Fig. 6. Comparison of the concentration profiles of the deposits at the origins of the chromatograms for samples of (a) L-(+)-lactic acid and (b) R,S-(±)-mandelic acid, showing the dependence of the amounts on the solvent used. The solutions of the acids were stored for 2 days

and finally chromatographed them. In each case, one fraction originating from the investigated sample remained at the origin whereas the rest of the sample moved along the chromatographic plate with the mobile phase. It is worthy of note that for all the hydroxy acids investigated the amount of the sample remaining at the origin depended on the solvent used. The largest amount was observed for 70% aqueous ethanol, the next largest for pure water, and the smallest amount for pure ethanol. As an example, in Fig. 6 we present concentration profiles of the deposits at the origins of the chromatograms recorded for samples of L-(+)-lactic acid and R,S-(±)-mandelic acid (in qualitative terms, the results obtained for S-(+)-mandelic acid were analogous).

It seemed rather obvious that deposits at the chromatogram origins represented a given polyacid (in Fig. 6, these are polylactic and polymandelic acids, respectively). The presence of this deposit is proof of the spontaneous and relatively easy condensation of these hydroxy acids in solution. Most probably, condensation of the hydroxy acid starts from the enol obtained from the acid. If so, then 70% ethanol provides the best conditions for condensation (with the largest sample deposit at the origin); pure water is less favourable (because water molecules are eliminated as a condensation product during the course of the reaction), and pure ethanol provides the worst conditions (because the condensation mechanism involves dissociation of chemical bonds and transfer of charged structural units, which can only be effective in the presence of water) hence the respective sample deposit at the origin is the lowest).

¹³C NMR Spectroscopy

The ¹³C NMR spectrum of L-(+)-lactic acid first stored for ten days in pure ethanol then, after removal of the ethanol, dissolved in deuterated chloroform, is given in Fig. 7. The main peaks at 20.19, 66.54, and 179.77 ppm can be attributed, respectively, to the methyl, asymmetric (C-2), and carbonyl carbon atoms of the monomeric lactic acid. In the vicinity of each of these three peaks we observe three new low-intensity peaks which can be attributed to the analogous carbon atoms, although in the repeating units of polylactic acid. Thus the signal originating from the methyl carbon atom occurs at 20.36 ppm, that from asymmetric carbon atom in the main chain at 68.94 ppm, and that from carbonyl carbon atom at 175.12 ppm.

Analogous peaks indicating formation of polymandelic acid can be observed in the ¹³C NMR spectrum of S-(+)-mandelic acid first stored for ten days in pure ethanol and then, after removal of the ethanol, dissolved in deuterated chloroform, although they are less distinct than for polylactic

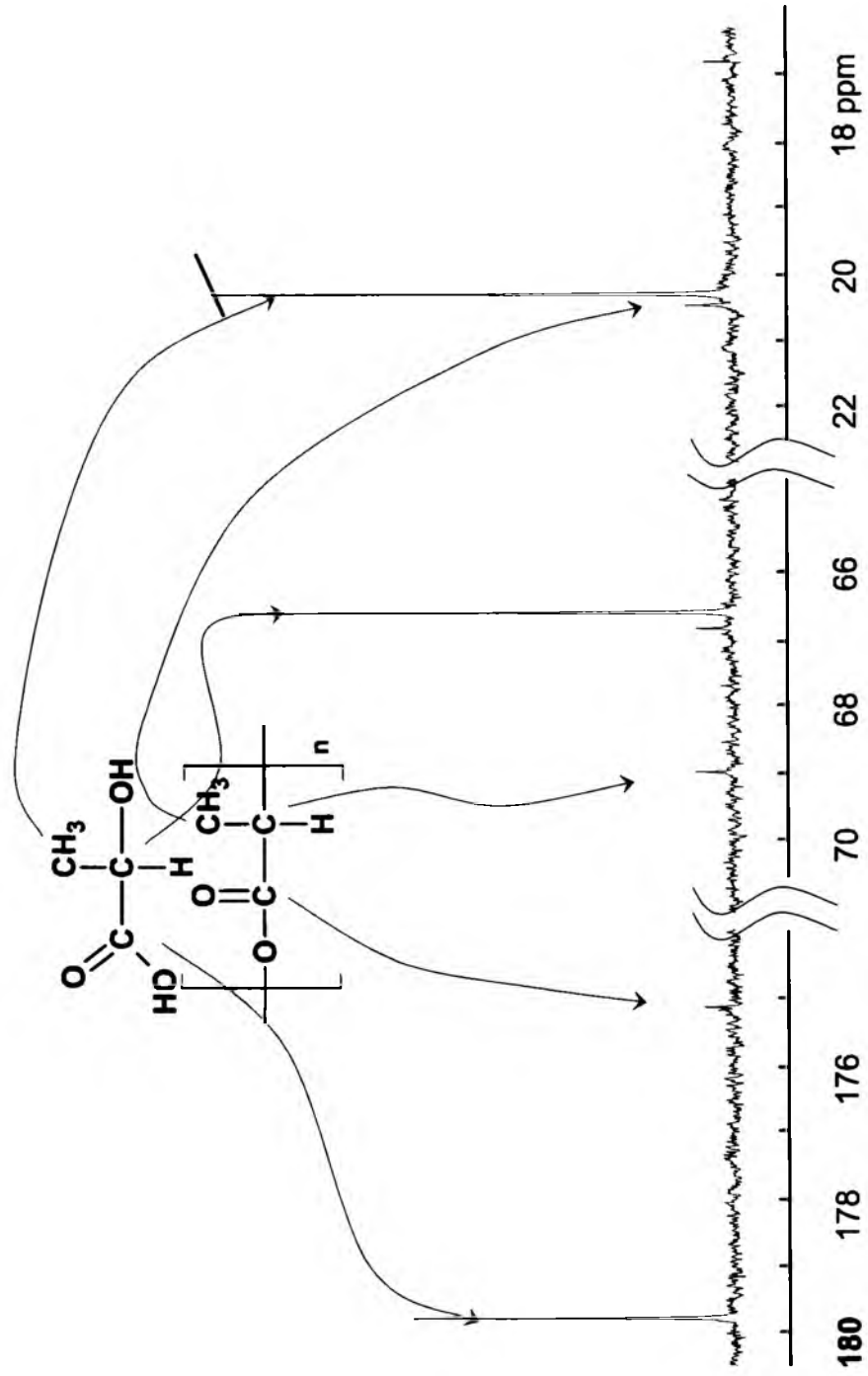


Fig. 7. 100-MHz ¹³C NMR spectrum of L-(+)-lactic acid, first dissolved and stored for ten days in pure ethanol, then recorded in CDCl₃ at 25°C

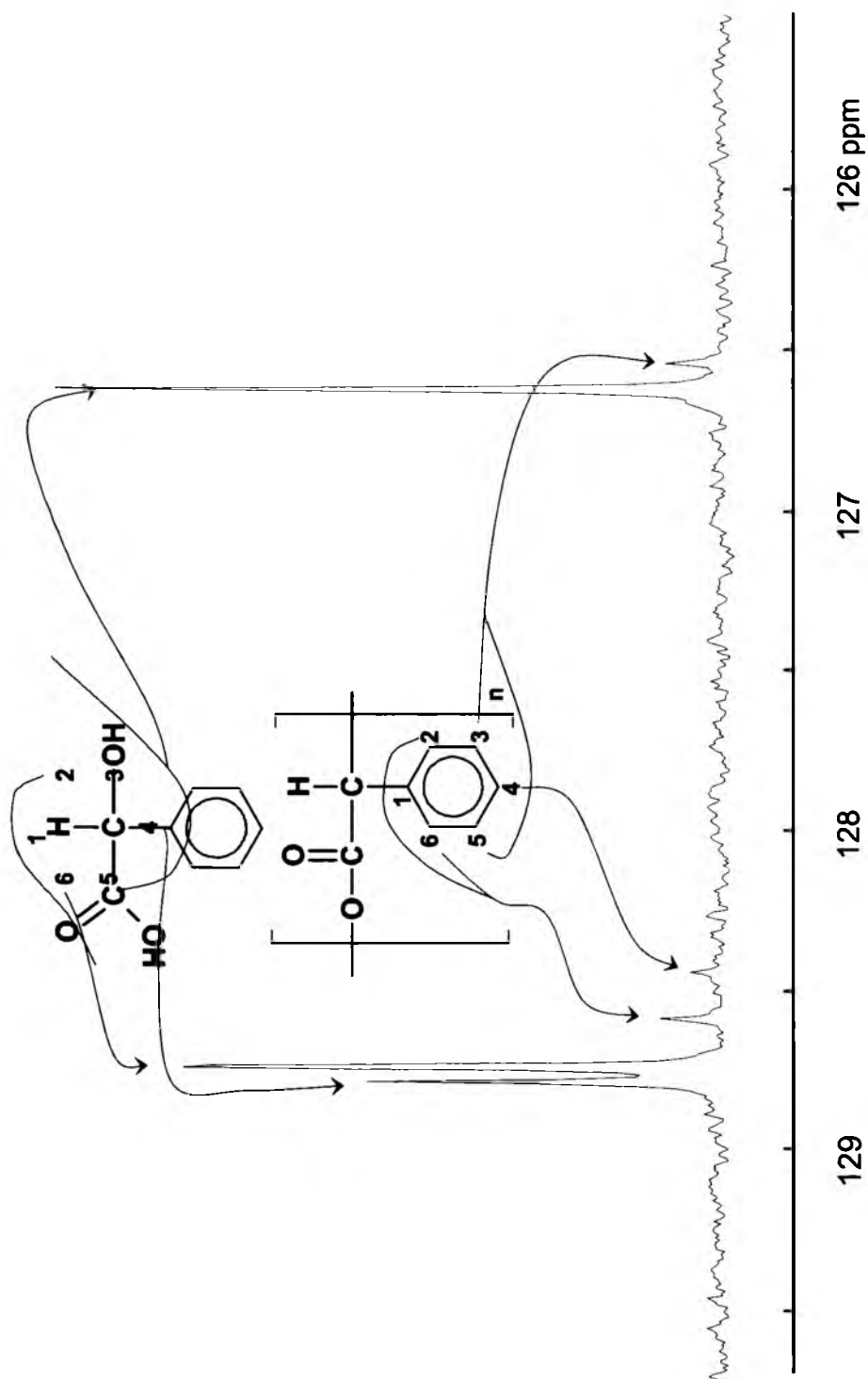


Fig. 8. 100-MHz ^{13}C NMR spectrum of *S*-(+)-mandelic acid, first dissolved and stored for ten days in pure ethanol, then recorded in CDCl_3 at 25°C

acid. Fig. 8 shows the aromatic region of the ^{13}C NMR spectrum of mandelic acid. In the vicinity of the signal originating from the 3,5-aromatic carbon atoms at 126.76 ppm, a low-intensity peak at 126.68 ppm can be observed; this can be attributed to the analogous carbon atoms in the repeating units of polymandelic acid. The peaks of C2 and C6 carbon at 128.88 ppm, and of C-4 carbon at 128.93 ppm in the aromatic ring of mandelic acid are also flanked by small peaks at 128.59 and 128.74 ppm, respectively, which can be attributed to the analogous carbon atoms in the repeating units of polymandelic acid.

The chemical shifts of the equivalent carbon atoms located in the end groups of both polyacids should be noticeably different from those of the carbon atoms situated in the central repeating units. These signals are not observed in the recorded spectra, however, which suggests a rather large number of the repeating units in the polymers and formation of relatively long polyacid chains.

Conclusions

- In this study we demonstrated the ability of the hydroxy acids lactic acid and mandelic acid to undergo spontaneous condensation, resulting in the respective polyacids.
- Formation of polylactic acid and polymandelic acid was demonstrated by means of TLC and ^{13}C NMR spectroscopy.
- The mechanism of spontaneous condensation of chiral hydroxy acids resembles that of amino acid peptidization in the sense that both condensation and peptidization seem a direct outcome of spontaneous oscillatory chiral conversion of the respective chiral carboxylic acids.
- The ability of hydroxy carboxylic acids to condense and form polyacids seems to be as general (almost a law of nature) as their ability to undergo spontaneous oscillatory chiral conversion (extensively discussed elsewhere by these authors).

Acknowledgement

The work of two of the authors (M.G. and D.K.) was partially supported by PhD scholarships granted to them in 2008 within the framework of the 'University as a Partner of the Economy Based on Science' (UPGOW) project, subsidized by the European Social Fund (EFS) of the European Union.

References

- [1] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **21**, 151–160 (2009)
- [2] M. Sajewicz, R. Piętka, A. Pieniak, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **15**, 131–149 (2005)
- [3] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, Ł. Wojtal, G. Grygierczyk, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **18**, 227–238 (2007)
- [4] M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, and T. Kowalska, *J. Planar Chromatogr.*, **21**, 43–47 (2008)
- [5] M. Sajewicz, M. Gontarska, Ł. Wojtal, D. Kronenbach, M. Leda, I.R. Epstein, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **31**, 1986–2005 (2008)
- [6] M. Sajewicz, D. Kronenbach, D. Staszek, M. Wróbel, G. Grygierczyk, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **31**, 2006–2018 (2008)
- [7] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, and T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **20**, 209–225 (2008)
- [8] R.E. Kirk and D.F. Othmer, *Encyclopedia of Chemical Technology*, Vol. 8, p. 168, The Interscience Encyclopedia, New York, 1952
- [9] <http://www.crossfirebeilstein.com/>
- [10] J. Schiffers, T. Rantanen, F. Schmidt, W. Bergmans, L. Zani, and C. Bolm, *J. Org. Chem.*, **71**, 2320–2331 (2006)
- [11] P.L. Polavarapu, L.P. Fontana, and H.E. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 94–99 (1986)
- [12] C.P. Whitman, J.G. Craig, and G.L. Kenyon, *Tetrahedron*, **41**, 1183–1192 (1985)
- [13] M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, M. Wróbel, R. Piętka, and T. Kowalska, *J. Planar Chromatogr.*, submitted for publication

TLC AND POLARIMETRIC INVESTIGATION OF THE OSCILLATORY *IN VITRO* CHIRAL CONVERSION OF *R*- β -HYDROXYBUTYRIC ACID

Mieczysław Sajewicz, Dorota Kronenbach, Monika Gontarska,
and Teresa Kowalska

Institute of Chemistry, University of Silesia, Katowice, Poland

□ Earlier we have shown that chiral aliphatic hydroxy acids, i.e., L-lactic acid, R- α -hydroxybutyric acid, and S- α -hydroxybutyric acid, can undergo oscillatory *in vitro* chiral conversion, exhibiting oscillatory changes in the chromatographic retention parameter (R_F) and the specific rotation ($[\alpha]_D$) for the periods of two or even many more weeks after preparation of the solutions in aqueous ethanol. As the phenomenon of spontaneous oscillatory chiral conversion with low molecular weight carboxylic acids dissolved in the abiotic aqueous media seems to be of a relatively general nature, it made us curious to examine steric limitations of this process. One essential question that we posed in this study regards the impact of the distance between the carboxylic group of the acid and the asymmetry center in the chiral molecule on its ability to undergo chiral conversion. With the earlier examined lactic acid and two α -hydroxybutyric acids, the hydroxyl group was placed in position α , hence the asymmetry center was directly neighboring the carboxylic group. It was the aim of this study, to examine one more low molecular weight hydroxy acid with the hydroxyl group placed in position β , hence with the asymmetry center separated by one methylene unit from carboxyl functionality acting as spacer. To this effect, we selected R- β -hydroxybutyric acid and investigated its ability to undergo a spontaneous oscillatory *in vitro* chiral conversion in the abiotic aqueous medium, for this purpose using thin layer chromatography and polarimetry as the best suiting analytical techniques. It was experimentally established that R- β -hydroxybutyric acid – similar to the earlier scrutinized α -hydroxy acids – can undergo the oscillatory chiral conversion and the methylene spacer between the carboxyl and the hydroxyl functionality cannot prevent this particular compound from undergoing steric conversion.

Keywords chiral TLC, enantioseparation of β -hydroxybutyric acid, oscillatory chiral conversion, polarimetry

INTRODUCTION

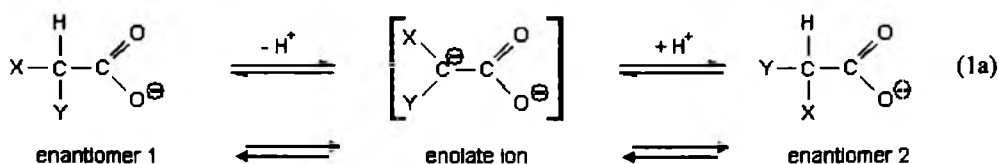
The remarkable phenomenon of spontaneous *in vitro* oscillatory chiral conversion of selected profens, amino acids, and hydroxy acids has been in

the focus of our attention for some time now. In papers,^[1-3] we reported on the chiral conversion of *S*(+)-ibuprofen, *S*(+)-naproxen, *S,R*(±)-2-phenylpropionic acid, *S*(+)-flurbiprofen, *R*(-)-flurbiprofen, and *S,R*(±)-ketoprofen. In papers,^[4-6] we reported on the analogous behavior of *L*-alanine, *L*-α-phenylalanine, and *L*-tyrosine.^[4-6] In papers,^[7,8] the oscillatory chiral conversion of the selected hydroxy acids, i.e., *L*-lactic acid, *R*-α-hydroxybutyric acid, *S*-α-hydroxybutyric acid, *R*-mandelic acid, and *S*-mandelic acid, was confirmed. Most of the reported cases of chiral conversion took place with acid samples dissolved in aqueous ethanol.

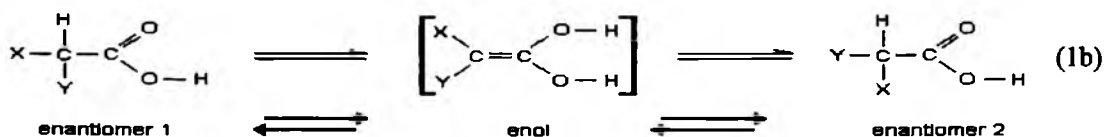
The general scheme of the discussed chiral conversion can simply be given by Eq. (1).



If we, however, consider chiral conversion of the discussed carboxylic acids in aqueous solutions more closely, then Eq. (1) can be replaced by Eq. (1a):^[9]



In the anhydrous media and in the presence of the trace amounts of water, the probable mechanism of chiral conversion can be given by Eq. (1b):^[10]



where X: -NH₂, -OH, -Ar, etc., and Y: -R, etc.

Owing to the results of our earlier studies, nowadays the phenomenon of the spontaneous oscillatory *in vitro* chiral conversion of the low-molecular weight carboxylic acids seems relatively common, which made us curious to know the scope of its universality and the structural limits thereof. All cases of the oscillatory chiral conversion so far described in papers,^[1-8] referred to carboxylic acids with the asymmetry center in position α, hence neighboring carboxylic functionality. It was the aim of this study, to examine one more low molecular weight hydroxy acid, this time with the hydroxyl group placed in position β, hence with the asymmetry center separated with one methylene unit from carboxyl functionality acting as spacer. To this effect, we selected *R*-β-hydroxybutyric acid and

investigated its ability to undergo spontaneous oscillatory *in vitro* chiral conversion in the abiotic aqueous medium. We were interested to check, if an extended distance between carboxylic functionality and the asymmetry center can hamper the discussed oscillatory process.

EXPERIMENTAL

R- β -Hydroxybutyric Acid

The structural formula of *R*- β -hydroxybutyric acid is given in Fig. 1. In our study, we used the samples of *R*- β -hydroxybutyric acid, manufactured by Fluka (Buchs, Switzerland; cat. # 54920).

For the TLC experiment, we used a solution of *R*- β -hydroxybutyric acid in ethanol – water (7:3, *v/v*), its concentration equal to 50 g L^{-1} ($4.80 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$). For the polarimetric experiment, we used a solution of *R*- β -hydroxybutyric acid in ethanol – water (7:3, *v/v*), its concentration equal to 9.3 g L^{-1} ($8.93 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$).

Methanol and dioxane used in our experiments were of HPLC purity grade (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), ethanol was of analytical purity grade (POCh, Gliwice, Poland), and water was double distilled and deionized in our laboratory.

Thin-Layer Chromatography (TLC)

Development of the chromatograms was carried out on commercial chromatographic plates precoated with 0.25 mm thick silica gel layer (20 cm \times 20 cm, manufactured by Merck; cat # 1.05715). Prior to the development, all plates were predeveloped with methanol – water (9:1, *v/v*) and dried at ambient temperature for 3 h, in order to wash out any possible impurities adsorbed on the solid silica gel layer in the course of the plate storage. Then the plates were impregnated by dipping them for 2 s in the $5.01 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ water – methanol (4:6, *v/v*) solution of $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (analytical purity grade, manufactured by POCh).

Thin-layer chromatographic development of the *R*- β -hydroxybutyric acid samples stored for certain amount of time was carried out at $22 \pm 1^\circ\text{C}$, using dioxane – water (9:1, *v/v*) as mobile phase.

The samples of *R*- β -hydroxybutyric acid were spotted on to the chromatographic plates with use of an AS 30 model automatic applicator

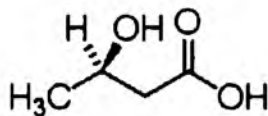
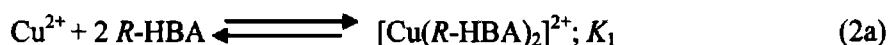


FIGURE 1 The chemical structure of *R*- β -hydroxybutyric acid.

(Desaga, Heidelberg, Germany). The 3 μ L aliquots of the samples were spotted 1 cm above the lower edge of the plate, eight samples per one plate, in the 2 cm distance from one another. The development distance was 8.5 cm and, thereafter, the plates were dried for 3 h at $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Finally, each lane was densitometrically scanned in the direction of the development and then the plates were sprayed with 5% (v/v) conc. H_2SO_4 in ethanol, and heated at $100\text{--}110^\circ\text{C}$ for ca. 10 min, to reveal the characteristic black spots of the hydroxy acid on a white background. This experiment was carried out for 4 days and the chromatograms of the gradually ageing *R*- β -hydroxybutyric acid solutions were developed in one day intervals.

The anticipated mechanism of enantioseparation of the *R* and *S*- β -hydroxybutyric acid antimers (due to the chiral conversion, the latter antimer is spontaneously generated in the sample) was through formation of the bidentate complexes between copper(II) cations deposited on the silica gel surface on the one hand and each of the two β -hydroxybutyric acids on the other (with the two different stability constants, K_1 and K_2). This mechanism can be summarized by the following scheme:



where *R*-HBA and *S*-HBA hold for *R*- β -hydroxybutyric acid and *S*- β -hydroxybutyric acid, respectively. The physicochemical condition of the enantioseparation is given by the inequality $K_1 \neq K_2$.

Densitograms were acquired with the aid of a CD 60 model densitometer (Desaga) equipped with the Windows-compatible ProQuant data acquisition and processing program. For scanning, the wavelength $\lambda = 326 \text{ nm}$ was selected from the mercury lamp and the geometry of the scanning beam was equal to $0.1 \text{ mm} \times 1.0 \text{ mm}$. The R_F values of the analytes were calculated from their respective concentration profiles.

The chromatograms were also scanned in visible light by use of a Chromimage flat-bed videoscanner (AR2i, Le Plessis Robinson, France), to save the pictures of the whole chromatograms and those of the individual chromatographic spots.

Polarimetry

Measurements of specific rotation ($[\alpha]_D$) of the investigated samples were carried out in the continuous manner. Continuous registration was carried out using a 341 model Perkin-Elmer precision polarimeter. Measurements were carried out for almost 14 days (331 h) at 22°C and

the wavelength used was 589 nm, which corresponds to the sodium D line. The cell length and volume were equal to, respectively, 1 cm and 3 mL. Specific rotation ($[\alpha]_D$) of the investigated samples was calculated from the below given equation:

$$[\alpha]_D = 100\alpha/cd \quad (3)$$

where α holds for the measured rotation angle (in angle degrees), D holds for the applied wavelength, λ (equal to 589 nm), c denotes concentration of the investigated compound in g 100 mL⁻¹ solution, and d is the optical path length in dm.

As reported in the literature, the specific rotation ($[\alpha]_D$) of *R*- β -hydroxybutyric acid measured at 25°C in the ethanol solution equals to -17.5° ^[11] and in the aqueous solution it is equal to -24.7° .^[12] In our own study, specific rotation of the freshly prepared solution of *R*- β -hydroxybutyric acid in aqueous ethanol at 22°C was equal to -16.5° .

RESULTS AND DISCUSSION

From the experience gained from our earlier investigations on the spontaneous oscillatory *in vitro* chiral conversion of the low molecular weight carboxylic acids dissolved in the abiotic aqueous media it shows that one of the best performing analytical techniques, able to trace steric lability of chiral compounds is thin layer chromatography. This statement is founded upon abundant experimental evidence presented in papers,^[1-8] despite the fact that an important and up to the date reference book^[13] focused on tracing steric conversion of multiple compound classes mentions exclusively high performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography (GC), and capillary electrophoresis (CE), as the adequate measuring techniques, and it fails to draw the researchers' attention to the advantages of a simple yet very efficient planar chromatography.

There are two major advantages of thin layer chromatography as a working tool in studying steric lability of chiral compounds. Due to these advantages, in certain cases TLC outperforms HPLC, GC, and CE, and in most cases, its performance is equivalent to those of the instrumental column techniques.

The first advantage of TLC is its ability to provide the two dimensional enantioseparations, which is inherent of the planar chromatography system alone, and it certainly cannot be obtained with any column chromatographic technique. Due to the fact that enantioseparations still remain one of the most sensitive separation tasks, 2D enantioseparations (performed either in 1D, or 2D development mode) certainly are a valuable bonus and this issue was extensively discussed in papers.^[14,15]

The second advantage of TLC is that the enantioseparated antimers remain preserved on the chromatographic plate and can be examined off-line by different instrumental analytical techniques (e.g., by UV and MS spectrometry applied *in situ*).

Another measuring technique very important for chiral research and traditionally used in this area is polarimetry. For the above reasons, the results presented in this study originate from TLC and polarimetry.

Thin-Layer Chromatography (TLC)

There were two goals of the research presented in this paper. The first one was to provide experimental evidence that *R*- β -hydroxybutyric acid can undergo a spontaneous oscillatory chiral conversion upon dissolution in ethanol – water, followed by storage of the obtained solution for a certain amount of time at ambient temperature. The second goal was to enantio-separate two antipodes of β -hydroxybutyric acid, obtained as an outcome of the oscillatory chiral conversion.

To this effect, we first prepared a solution of the optically pure *R*- β -hydroxybutyric acid in ethanol – water and stored it for the period of four days. After four days, the stored sample was enantioseparated, as earlier described in Experimental, and the obtained chromatograms were densitometrically scanned. Up to our best knowledge, this was the first attempt to enantioseparate β -hydroxybutyric acid by means of TLC.

In Fig. 2, we showed four videoscans of the chromatograms visualized by spraying them with the sulphuric acid solution. Each chromatogram represents the investigated sample after a different storage period. In the first three chromatograms, i.e., those obtained for the *R*- β -hydroxybutyric acid solution stored for 1, 20, and 47 hours, a single chromatographic spot is visible. In the fourth chromatogram valid for the sample stored for 69 hours, two chromatographic spots appear namely the left-handed and the right-handed one. Thus, from Fig. 2d it can be deduced, that after 69 h storage period chiral conversion of the *R* compound yielded in the mixture quantitatively close to the racemate, which enabled good visualization of the enantioseparation effect. This result can even better be seen from Fig. 3, which represents the 3D picture of the enantioseparated β -hydroxybutyric acid. Moreover, from Figs. 2a-c, it can be deduced that the left-handed spot visible on these videoscans (and on the 3D chromatogram) represents enantiomer *R*, and the right-handed spot holds for enantiomer *S*. The separation outcome shown in Figs. 2 and 3 is convincing enough to prove that in spite of the applied 1D development mode, the obtained enantioseparation turns up two-dimensional. Combining our earlier experience^[14–16] with the present one it can be concluded that Cu(II) contributes to vertical enantioseparation (i.e., to that in the direction of the

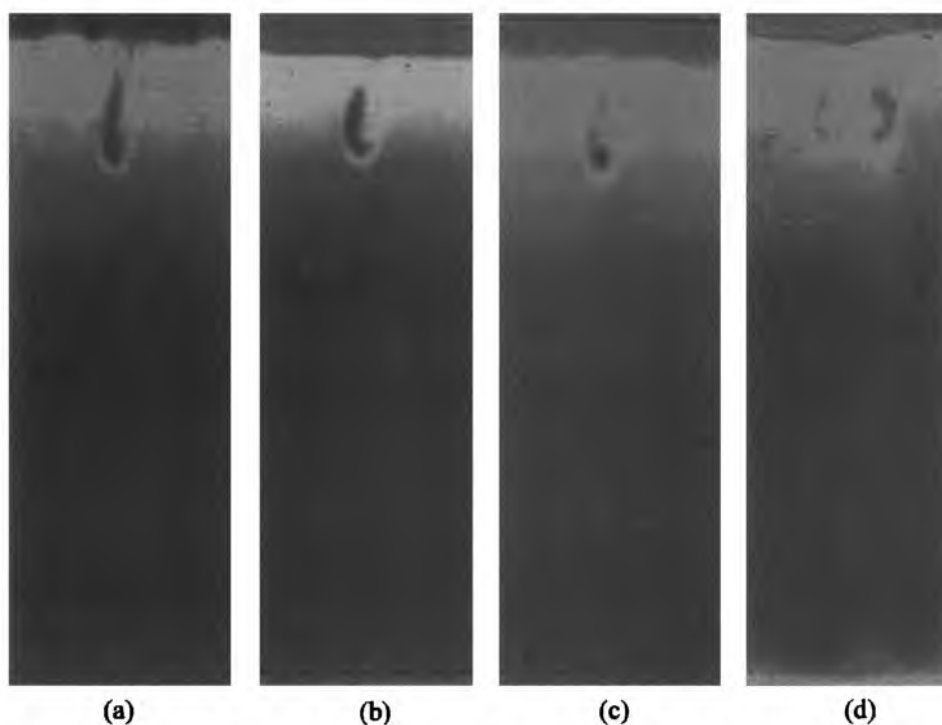


FIGURE 2 Videoscans of the chromatograms obtained for *R*- β -hydroxybutyric acid dissolved in ethanol – water 7:3 (*v/v*) and stored in the solution for (a) 1 h, (b) 20 h, (c) 47 h, and (d) 69 h.

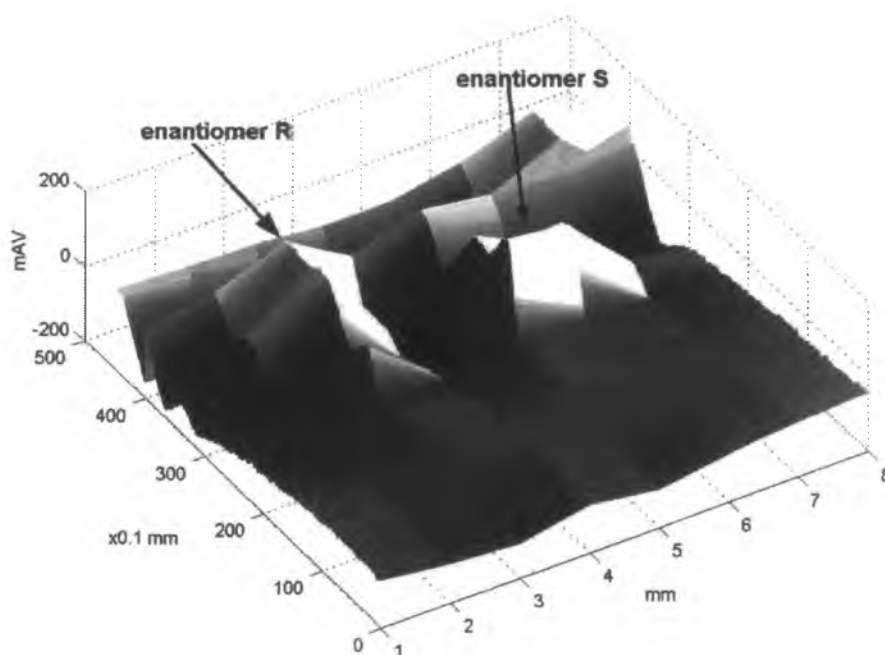


FIGURE 3 Three-dimensional representation of the chromatogram of β -hydroxybutyric acid after development of *R*- β -hydroxybutyric acid solution stored for 69 hours. Solution was in ethanol – water 7:3 (*v/v*) and stored at $22 \pm 1^\circ\text{C}$. The 3D picture was based on densitometric scans taken at 1-mm intervals.

mobile phase flow), and microcrystalline silica gel is responsible for horizontal enantioseparation (i.e., that perpendicular to the former one).

In Figs. 4a,b, we presented densitograms of *R*- β -hydroxybutyric acid and *S*- β -hydroxybutyric acid, scanned in a parallel way along the two different tracks, in order to better visualize positions of their respective concentration maxima. From Fig. 4, it can be seen that the retardation factors (i.e., the R_F values) of the two antimers substantially differ. R_F is valid for the *R* species equals 0.86, while that valid for the *S* species equals to 0.78 (so the difference between these two considerably surpasses the experimental error of the individual R_F values equal to ± 0.02).

Polarimetry

The main goal of polarimetric experiment was to collect evidence on the occurrence of the oscillatory chiral conversion of β -hydroxybutyric acid. To this effect, we have for the first time used in our studies polarimeter with

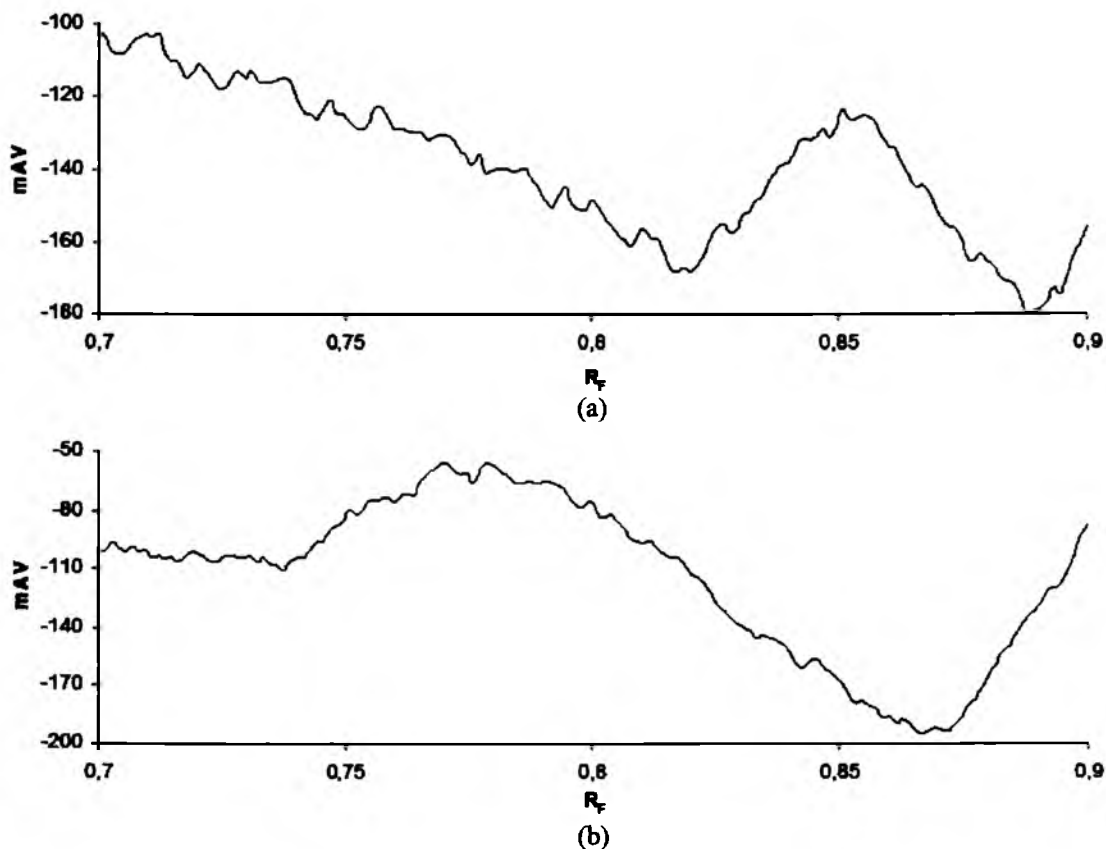
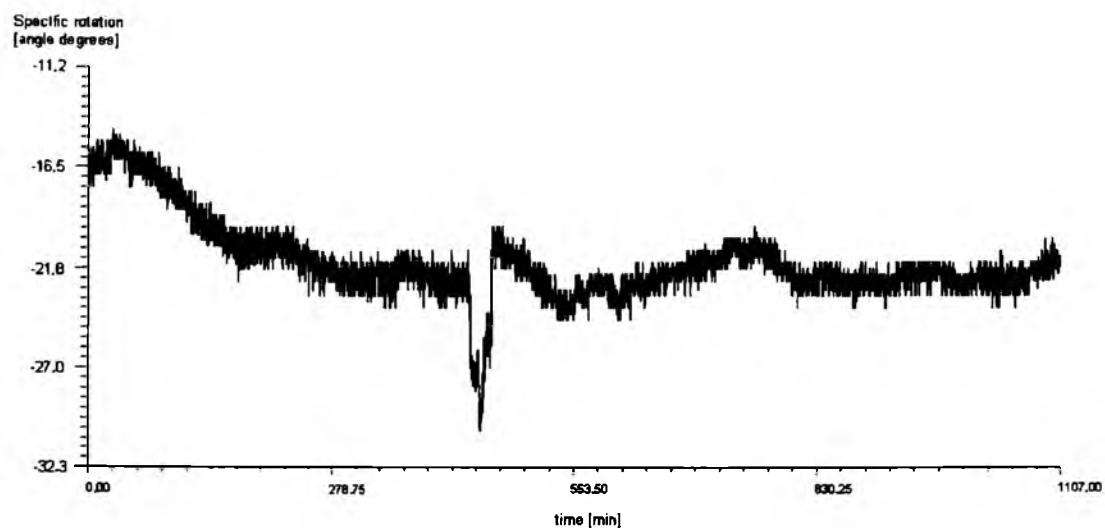
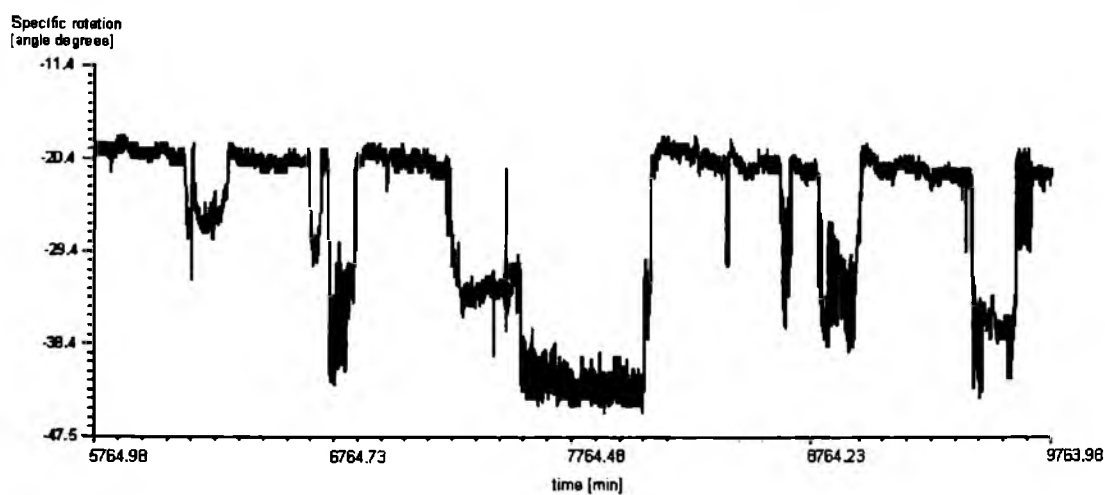


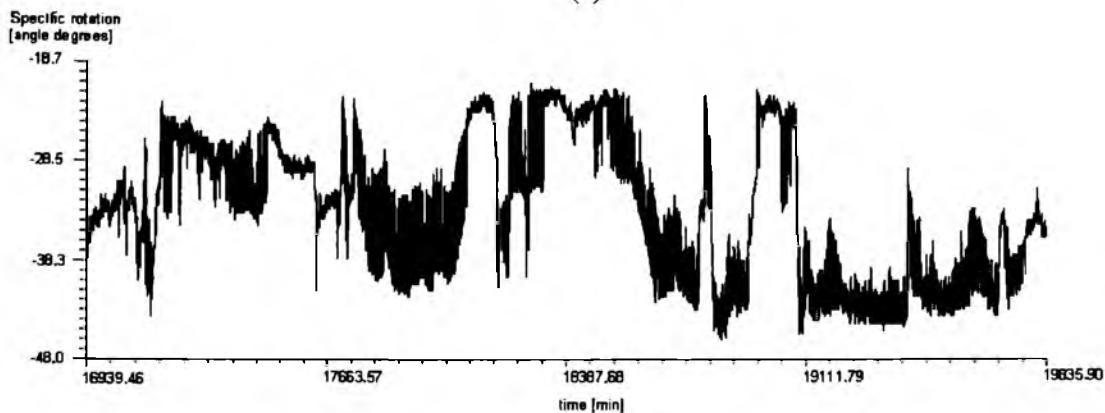
FIGURE 4 Densitometrically scanned concentration profiles of (a) *R*- β -hydroxybutyric acid and (b) *S*- β -hydroxybutyric acid. Because of the 2D enantioseparation of the β -hydroxybutyric acid antimers in the 1D development mode, the demonstrated concentration profiles represent densitometric scans for the tracks where the *R* and the *S* species obtain their respective maxima.



(a)



(b)



(c)

FIGURE 5 Continuous polarimetric registration of specific rotation ($[\alpha]_D$) in the function of time for *R*- β -hydroxybutyric acid dissolved in ethanol–water, 7:3 (v/v) and stored (a) from 0 to 19 h, (b) from 96 to 163 h, and (c) from 282 to 331 h at $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

continuous registration. The obtained results are shown in Fig. 5. From the plots shown in this figure it clearly comes out that with β -hydroxybutyric acid, the observed changes of specific rotation ($[\alpha]_D$) are considerable and the amplitude can embrace even 20 angle degrees. This result is a convincing polarimetric proof of the occurrence of the oscillatory chiral conversion with the investigated carboxylic species.

Further, it has to be said that the polarimetric results witness an enhanced change of the specific retention values after a more stable period of the several initiatory days. Namely, much more vigorous oscillations can be seen in Figs. 5b and 5c, than in Fig. 5a. This observation coincides well with the thin-layer chromatographic results and more specifically, with the fact that the two β -hydroxybutyric acid antimers were first visualized for the sample stored for 69 hours (as shown in Fig. 2d).

CONCLUSIONS

It can be concluded that the 2D thin-layer chromatographic enantioseparation of the two β -hydroxybutyric acids in the applied 1D chromatographic development mode is possible. In our study, this enantioseparation was achieved owing to the joint effect of copper(II) cation (which acts as central ion for the bidentate complexes involving the two enantioseparated antimers) and to the microcrystalline chirality of silica gel. Further – based on our earlier experience – we believe that copper(II) cation is responsible for the vertical separation of the two investigated β -hydroxybutyric acid antimers (which is expressed by the two different R_f values for the two maxima of the respective concentration profiles, as shown in Fig. 4), whereas microcrystalline chirality of silica gel is responsible for the horizontal enantioseparation (as presented the best in Fig. 2d). Thus, TLC has provided direct proof that *R*- β -hydroxybutyric acid undergoes spontaneous chiral conversion, when dissolved in aqueous ethanol and stored for certain period of time.

Polarimetrically, we confirmed that – similar to the other previously investigated chiral carboxylic acids – spontaneous chiral conversion of β -hydroxybutyric acid is oscillatory in nature.

ACKNOWLEDGMENT

The work of two of the authors (D.K. and M.G.) was partially supported by PhD scholarships granted to them in 2008 within the framework of the ‘University as a Partner of the Economy Based on Science’ (UPGOW) project, subsidized by the European Social Fund (EFS) of the European Union.

REFERENCES

1. Sajewicz, M.; Piętko, R.; Pieniak, A.; Kowalska, T. Application of thin-layer chromatography (TLC) to investigating oscillatory instability of the selected profen enantiomers. *Acta Chromatogr.* **2005**, *15*, 131–149.
2. Sajewicz, M.; Gontarska, M.; Wróbel, M.; Kowalska, T. Enantioseparation and oscillatory transenantiomerization of *S,R*(±)-ketoprofen, as investigated by means of thin layer chromatography with densitometric detection. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* **2007**, *30*, 2193–2208.
3. Sajewicz, M.; Gontarska, M.; Kronenbach, D.; Wojtal, Ł.; Grygierczyk, G.; Kowalska, T. A study on the oscillatory *in vitro* transenantiomerization and enantioseparation of the flurbiprofen antimers by means of thin layer chromatography (TLC). *Acta Chromatogr.* **2007**, *18*, 227–238.
4. Sajewicz, M.; Kronenbach, D.; Gontarska, M.; Kowalska, T. TLC and polarimetric investigation of the oscillatory *in-vitro* chiral inversion of *L*-alanine. *J. Planar Chromatogr. – Modern TLC* **2008**, *21*, 43–47.
5. Sajewicz, M.; Gontarska, M.; Wojtal, Ł.; Kronenbach, D.; Leda, M.; Epstein, I.R.; Kowalska, T. Experimental and model investigation of the oscillatory transenantiomerization of *L*-α-phenylalanine. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **2008**, *31*, 1986–2005.
6. Sajewicz, M.; Kronenbach, D.; Staszek, D.; Wróbel, M.; Grygierczyk, G.; Kowalska, T. Experimental investigation of the oscillatory transenantiomerization of *L*-tyrosine. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* **2008**, *31*, 2006–2018.
7. Sajewicz, M.; John, E.; Kronenbach, D.; Gontarska, M.; Kowalska, T. TLC study of the separation of the enantiomers of *L*-lactic acid. *Acta Chromatogr.* **2008**, *20*, 367–382.
8. Sajewicz, M.; Kronenbach, D.; Gontarska, M.; Wróbel, M.; Piętko, R.; Kowalska, T. TLC in a search for structural limitations of spontaneous oscillatory *in-vitro* chiral conversion. α-Hydroxybutyric and mandelic acids. *J. Planar Chromatogr. – Modern TLC* **2009**, *22*, 241–248.
9. Belanger, P.; Atkinson, J.G.; Stuart, R.S. Exchange reactions of carboxylic acid salts. Kinetics and mechanism. *Chem. J. Chem. Soc. D: Commun.* **1969**, 1067–1968.
10. Xie, Y.; Liu, H.; Chen, J. Kinetics of base catalyzed racemization of ibuprofen enantiomers. *Int. J. Pharm.* **2000**, *196*, 21–26.
11. MacMillan, J.; Simpson, T.J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1973**, *1*, 1487–1493.
12. Seebach, D.; Zueger, M. *Helv. Chim. Acta* **1982**, *65*, 495–503.
13. Wolf, C. *Dynamic Stereochemistry of Chiral Compounds – Principles and Applications*, RSC Publishing: Cambridge, 2008.
14. Sajewicz, M.; Hauck, H.-E.; Drabik, G.; Namysło, E.; Głód, B.; Kowalska, T. Tracing possible structural asymmetry of silica gel used for precoating thin-layer chromatographic plates. *J. Planar Chromatogr. – Modern TLC* **2006**, *19*, 278–281.
15. Sajewicz, M.; Grygierczyk, G.; Gontarska, M.; Kowalska, T. Enantioseparation of *S,R*(±)-ketoprofen on plain silica gel layers with achiral mobile phase. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* **2007**, *30*, 2185–2192.
16. Sajewicz, M.; Gontarska, M.; Dąbrowa, A.; Kowalska, T. Use of video densitometry and scanning densitometry to study an impact of silica gel and *L*-arginine on the retention of ibuprofen and naproxen in TLC systems. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* **2007**, *30*, 2369–2383.

Spontaneous oscillatory *in vitro* chiral conversion of simple carboxylic acids and its possible mechanism

Mieczysław Sajewicz^a, Marek Matlengiewicz^a, Marcin Leda^b,
Monika Gontarska^a, Dorota Kronenbach^a, Teresa Kowalska^a
and Irving R. Epstein^{b*}

In earlier studies, we have collected experimental evidence (mostly from thin-layer chromatography and polarimetry) on the spontaneous oscillatory *in vitro* chiral conversion of simple carboxylic acids dissolved in 70% aqueous ethanol. To elucidate this phenomenon, we developed a simple theoretical model of two linked Templators. Recently, we have obtained additional experimental evidence of the spontaneous condensation of chiral carboxylic acids, based on the biuret test (amino acids), high performance liquid chromatography, and ¹³C NMR spectroscopy (profens and hydroxy acids). We briefly describe our experimental results in the context of the existing literature and outline an improved theoretical model for these phenomena. Our system resembles in some respects the reported oscillatory condensation of organic silanols. Here, the key reaction is the formation of carboxylic acid-derived enols. Finally, we discuss the importance of the oscillatory chiral conversion of simple carboxylic acids for biochemistry, pharmacology, and related life sciences. Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: chiral carboxylic acids; condensation; enolization; oscillatory chiral conversion; Templator model

INTRODUCTION

The remarkable phenomenon of spontaneous *in vitro* oscillatory chiral conversion of selected profens, amino acids, and hydroxy acids has been the focus of our attention for some time. In papers,^[1–3] we reported on the oscillatory chiral conversion of *S*(+)-ibuprofen, *S*(+)-naproxen, *S*,*R*(±)-2-phenylpropionic acid, *S*(+)-flurbiprofen, *R*(-)-flurbiprofen, and *S*,*R*(±)-ketoprofen. In papers,^[4–6] we described analogous behavior in *L*-alanine, *L*-α-phenylalanine, and *L*-tyrosine.^[4–6] In papers,^[7,8] the oscillatory chiral conversion of the hydroxy acids *L*-lactic acid, *R*-α-hydroxybutyric acid, *S*-α-hydroxybutyric acid, *R*-mandelic acid, and *S*-mandelic acid was characterized. Most of these oscillatory chiral conversion reactions took place in acidic samples dissolved in 70% aqueous ethanol. Oscillatory chiral conversion has also been reported in the crystallization of the (+) and (–) enantiomers of 2-azabicyclo [2.2.1]hept-5-en-3-one^[9].

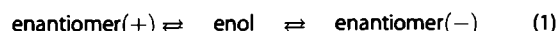
Much of the experimental evidence for this phenomenon originates from thin-layer chromatography (TLC) and polarimetry. The TLC evidence is mostly in the form of changing concentration profiles and unstable retardation coefficient (*R_f*) values of the investigated analytes. In Fig. 1, we present an example of TLC results for *S*,*R*(±)-2-phenylpropionic acid dissolved in 70% aqueous ethanol and then stored for 72 h at 22 °C, with intermittent chromatographic measurements on the stored sample.^[1]

Polarimetric evidence was collected in the non-continuous and continuous registration modes. In Fig. 2(a, b), we show examples of the long-term chiral conversion of *S*(+)- and *R*(-)-flurbiprofen dissolved in 70% aqueous ethanol and then stored at 22 °C for several days.^[3] These data were collected in the non-continuous registration mode.

In Fig. 3, we present the continuously registered oscillatory changes of the specific rotation ([α]_D) for a freshly prepared 70%

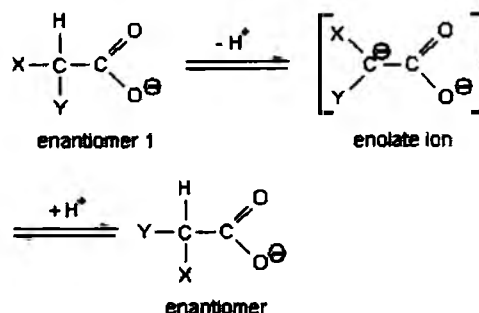
aqueous ethanol solution of *R*(-)-flurbiprofen, with monitoring carried out for 540 min.

The general scheme of these chiral conversions can be summarized as



If we consider chiral conversion of selected carboxylic acids in an aqueous solution in more detail, then Eqn (1) can be replaced by Eqn (1a)^[10]:

(1a)



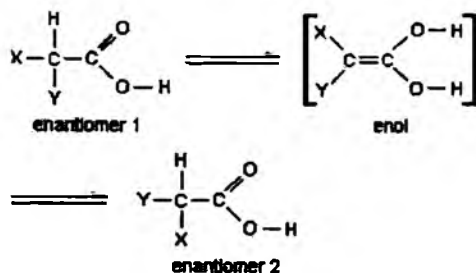
* Correspondence to: I. R. Epstein, Chemistry Department, MS 015, Brandeis University, Waltham, MA 02454-9110, USA.
E-mail: epstein@brandeis.edu

^a M. Sajewicz, M. Matlengiewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, T. Kowalska, D. Kronenbach, T. Kowalska
Institute of Chemistry, University of Silesia, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland

^b M. Leda, I. R. Epstein
Chemistry Department, MS 015, Brandeis University, Waltham, Massachusetts 02454-9110, USA

In anhydrous media and in the presence of trace amounts of water, the probable mechanism of chiral conversion is given by Eqn (1b).^[11]

(1b)



where X: -NH₂, -OH, -Ar, etc., and Y: -R, etc.

MODELING STUDIES

Based on the reaction scheme (Eqn (1)), in paper^[5] we proposed a simple model of chiral conversion, adapting an earlier oscillatory mechanism designated as the Templator.^[12,13] Here, we propose two models which may explain the observed oscillation in these experimental systems. The first model is based on autocatalytic dimerization. Oscillations appear in this model in both enantiomer subsystems. Racemization is a linear reversible reaction coupling the two oscillating subsystems. In such a system, in addition to simple oscillations, quasiperiodic (Fig. 4) and mixed mode oscillations consisting of mixtures of large and small amplitude oscillations are possible as well. Instability of the stationary state leading to pattern formation in a spatially extended system is also possible, because such instability requires that the diffusion coefficient of dimers be smaller than that of monomers, which is physically reasonable.

In our model we consider the concentrations of enantiomers S, R and their homodimers S₂, R₂. We assume that the dimerization reaction may be uncatalyzed

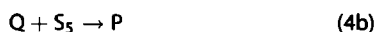
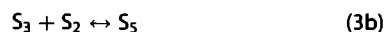
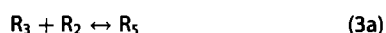


or catalyzed by the dimers themselves (autocatalysis):



For simplicity, we ignore the formation of heterodimers, though it is only necessary to assume that this process is much slower than homodimer formation.

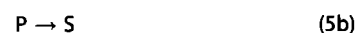
We also consider a reservoir of oligomers, which acts as a sort of buffer, able to remove dimers and introduce monomers into the system. Dimers may be removed by the creation of oligomers R₃, S₃, Q, and P.



If we make a quasi-steady state approximation for [R₃] and assume that the total concentrations [R₃] + [R₅], [S₃] + [S₅], and [Q] are roughly constant, the rate of removal of dimers is

not linear but is instead proportional to $k_2 b_2 / (1 + b_2)$ where b_2 denotes [R₂].

Monomers are introduced to the system from the reservoir by reactions like



The rates of steps (5a) and (5b) are constant and small but differ because the concentrations of S and R in the reservoir are different. We assume that racemization is a simple linear reaction



The behavior of the system defined above is described by four dimensionless kinetic equations

$$da_1/dt = \epsilon(k_{01} + k_1(b_1 - a_1^2) - 2a_1^2 b_1 + k_3(a_2 - a_1)) \quad (7a)$$

$$db_1/dt = a_1^2 b_1 - k_1(b_1 - a_1^2) - \frac{k_2 b_1}{1 + b_1} \quad (7b)$$

$$da_2/dt = \epsilon(k_{02} + k_1(b_2 - a_2^2) - 2a_2^2 b_2 - k_3(a_2 - a_1)) \quad (8a)$$

$$db_2/dt = a_2^2 b_2 - k_1(b_2 - a_2^2) - \frac{k_2 b_2}{1 + b_2} \quad (8b)$$

where a_1 , b_1 , a_2 , and b_2 are the dimensionless concentrations of S, S₂, R and R₂, respectively, and k_{01} , k_{02} , k_1 , k_2 , and k_3 are dimensionless constants which are functions of the rate constants of reactions (1)–(6).

At least two observations support the use of the model described above. First, autocatalytic dimerization has been found in chemical reactions in which the breaking of the mirror symmetry of enantiomers occurs (Soai reaction^[14]). Second, oscillations based on autocatalytic dimerization should be more robust at lower temperature, because the dimerization equilibrium (1) should then be shifted toward the formation of dimers. More robust oscillations are indeed seen at lower temperatures in our experiments^[1,4,6].

The second approach is based on the model of Plasson *et al.*^[15] In this model, oscillations appear as the result of coupling between enantiomers. This model appears particularly relevant for systems involving condensation or peptidization in which the condensate (dipeptide) SR has different chemical properties than RS, e.g., where only the residue on the left undergoes epimerization.



Oscillations appear in the system (9)–(13) only if the rate constant for the formation of heterodimers (12) is greater than that for homodimers (10) (Fig. 5).

Our model of two linked Templators accounts for the experimentally observed chiral conversion of simple carboxylic acids.

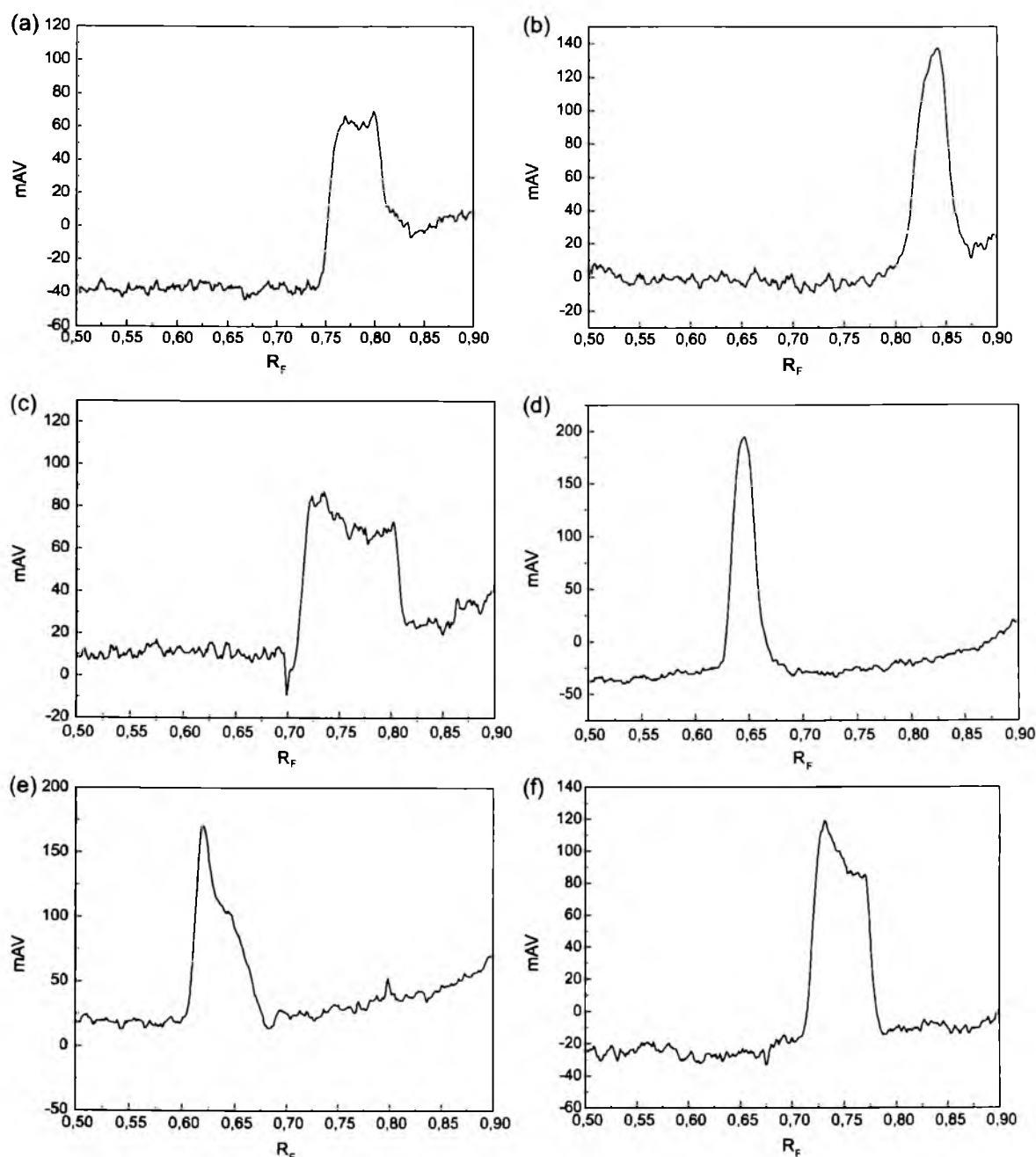


Figure 1. Sequence of densitometric concentration profiles of *S,R*(±)-2-phenylpropionic acid after: (a) 0 h (racemic mixture); (b) 22.5 h (*S*(+) form); (c) 27.5 h (racemic mixture); (d) 46.5 h (*R*(-) form); (e) 51.5 h (shift from *R*(-) form to racemic mixture); and (f) 70.5 h (racemic mixture); storage time at 22°C. Changes of the peaks' concentration profiles are accompanied by changing R_F values. Stationary phase: silica gel 60 F₂₅₄ (precoated TLC plates; Merck, Darmstadt, Germany; cat. # 1.05715) impregnated with *L*-arginine. Mobile phase: acetonitrile–methanol–water, 5:1:0.75 (v/v), containing several drops of acetic acid^[1]

However, it does not propose any realistic chemical reaction (or physical process) responsible for the oscillatory removal of the reaction template (assumed to be an H-bonded cyclic homodimer of the starting carboxylic acid). The extreme simplicity of the process summarized in Eqn (1) draws attention to the intermediate reaction product (enolate ion or enol) as the possible origin of a nonlinear process. So far, no oscillatory process involving this intermediate reaction product has been discovered.

EXPERIMENTAL RESULTS

We have recently demonstrated that the profens, amino acids, and hydroxy acids we have investigated undergo not only chiral conversion but also spontaneous condensation^[16,17]. In Reference^[16], the ability of *R*-phenylglycine and *S*-phenylglycine (dissolved in 70% aqueous ethanol) to undergo rapid, nearly instantaneous, peptidization was demonstrated by TLC and the biuret test. An analogous, though less rapid, outcome

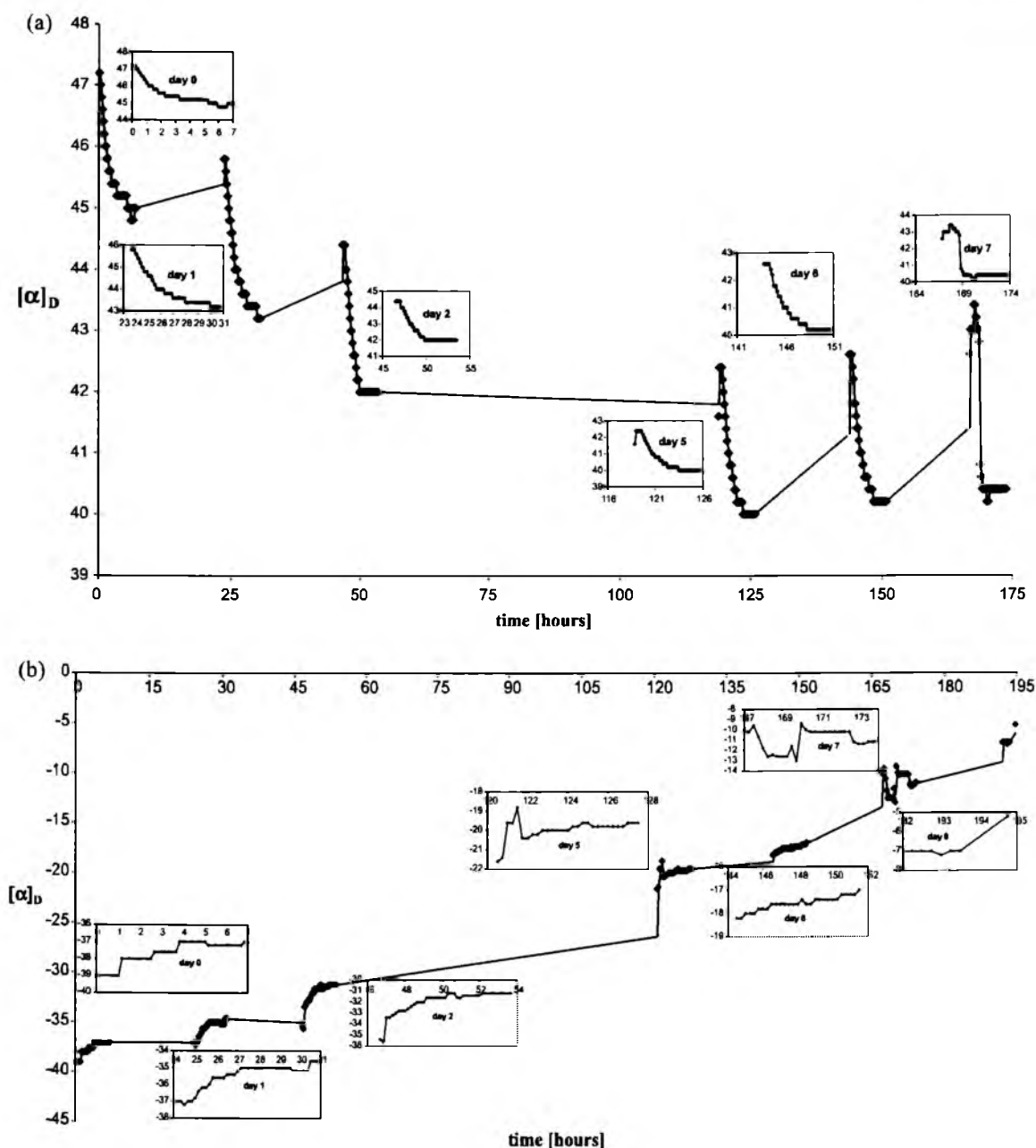


Figure 2. Oscillatory changes of the specific rotation, $[\alpha]_D$, for (a) *S*(+)-flurbiprofen and (b) *R*(-)-flurbiprofen dissolved in 70% aqueous ethanol and stored at 22°C. The general trend of the changes is indicated by the solid line, and insets show the changes on selected days of the experiment^[3]

was obtained with *L*-alanine and *L*-phenylalanine. In reference^[17], we presented experimental evidence for the spontaneous condensation of selected hydroxy acids (i.e., *L*-lactic acid and *S*(+)-mandelic acid). We have also amassed (unpublished) experimental evidence of spontaneous condensation of profens^[18]. The evidence for hydroxy acid and profen condensation originates from ¹³C NMR spectroscopy. In Fig. 6, we present an example of ¹³C NMR spectroscopic evidence of the spontaneous condensation of *L*-lactic acid and *S*(+)-mandelic acid, and in Fig. 7, of spontaneous condensation of *S*(+)-ketoprofen. High performance liquid chromatography (HPLC) experiments^[19] provide further support for the spontaneous condensation of

S(+)-ketoprofen. In Fig. 8, we present a sequence of chromatographic 'snapshots' showing formation and then disappearance of aging products derived from ketoprofen (most probably, ketoprofen condensates), and oscillations of the peak heights corresponding to the starting material, *S*(+)-ketoprofen, and the first condensation product. The HPLC peak heights are roughly proportional to the respective concentrations.

Summing up, storage of profens, amino acids, and hydroxy acids in aqueous organic solution results in two parallel spontaneous processes: (i) oscillatory chiral conversion and (ii) condensation. A simple scheme for such a process in profens is shown below.

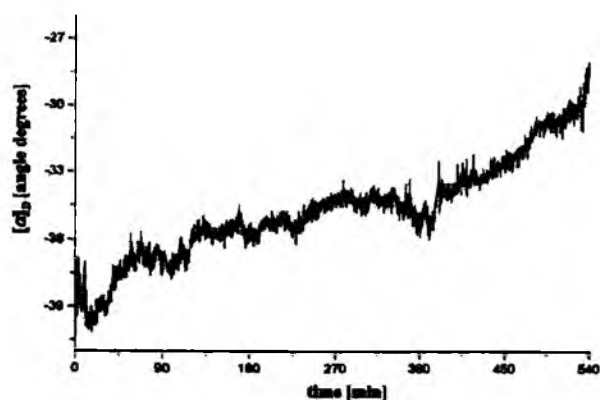


Figure 3. Oscillatory changes of the specific rotation, $[\alpha]_D$, for *R*(-)-flurbiprofen dissolved in 70% aqueous ethanol and stored at 22°C for 540 min

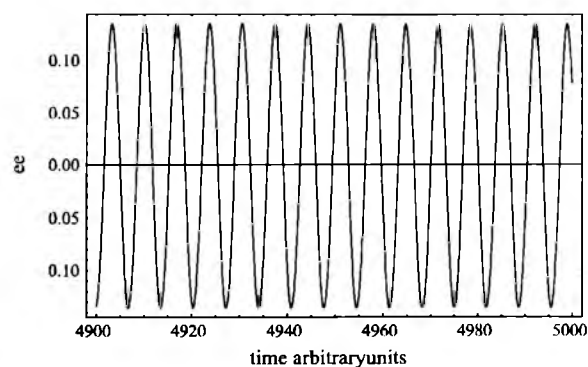
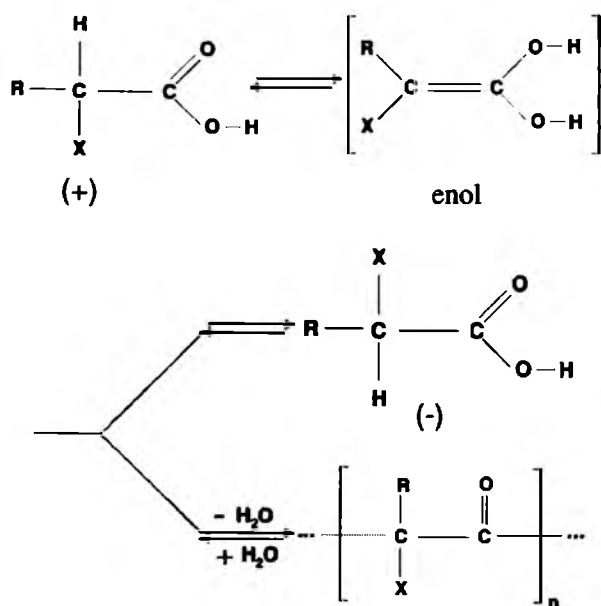


Figure 5. Enantiomeric excess $ee = ([R] - [S] + 2[R_2] - 2[S_2])/c$ for $c = 1$, $k_9 = 1$, $k_{-9} = 0.1$, $k_{10} = 1$, $k_{11} = 1$, $k_{12} = 100$, $k_{13} = 1$, simulated with Eqns (9)–(13)

DISCUSSION

With amino acids and hydroxy acids, the analogous condensation pathways are also possible, resulting, respectively, in peptidization and esterification. The kinetics of spontaneous condensation of profens, amino acids, and hydroxy acids in aqueous ethanol has not yet been studied in detail, and hence it cannot be concluded whether it is nonlinear or linear in nature. In our forthcoming studies, we will focus on the investigation of these dynamics.

In this context, it is noteworthy that oscillatory condensation has been reported in another system^[20,21]. Interestingly, the experimental evidence presented in those studies also originates



where $R = \text{CH}_3$, $X = \text{Ar}$.

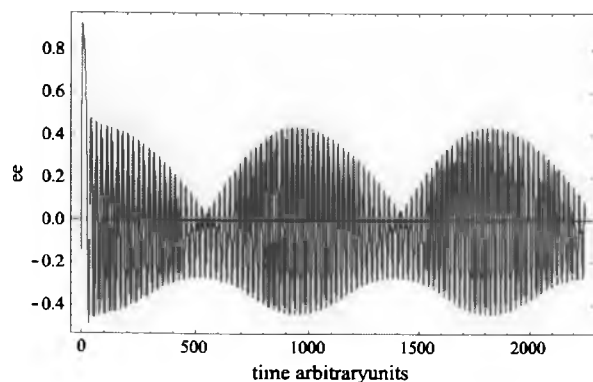


Figure 4. Complex behavior of the enantiomeric excess $ee = (a_1 - a_2 + 2b_1 - 2b_2)/(a_1 + a_2 + 2b_1 + 2b_2)$ simulated with the coupled Templator model

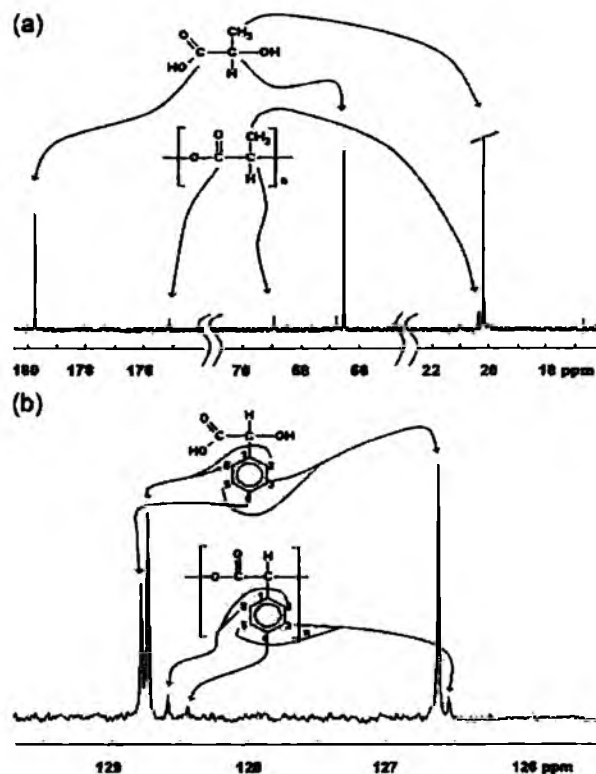


Figure 6. 100 MHz ^{13}C NMR spectra of (a) *L*(+)-lactic acid and (b) *S*(+) mandelic acid, first dissolved and stored for 10 days in pure ethanol, and then recorded in CDCl_3 at 25 °C^[16]

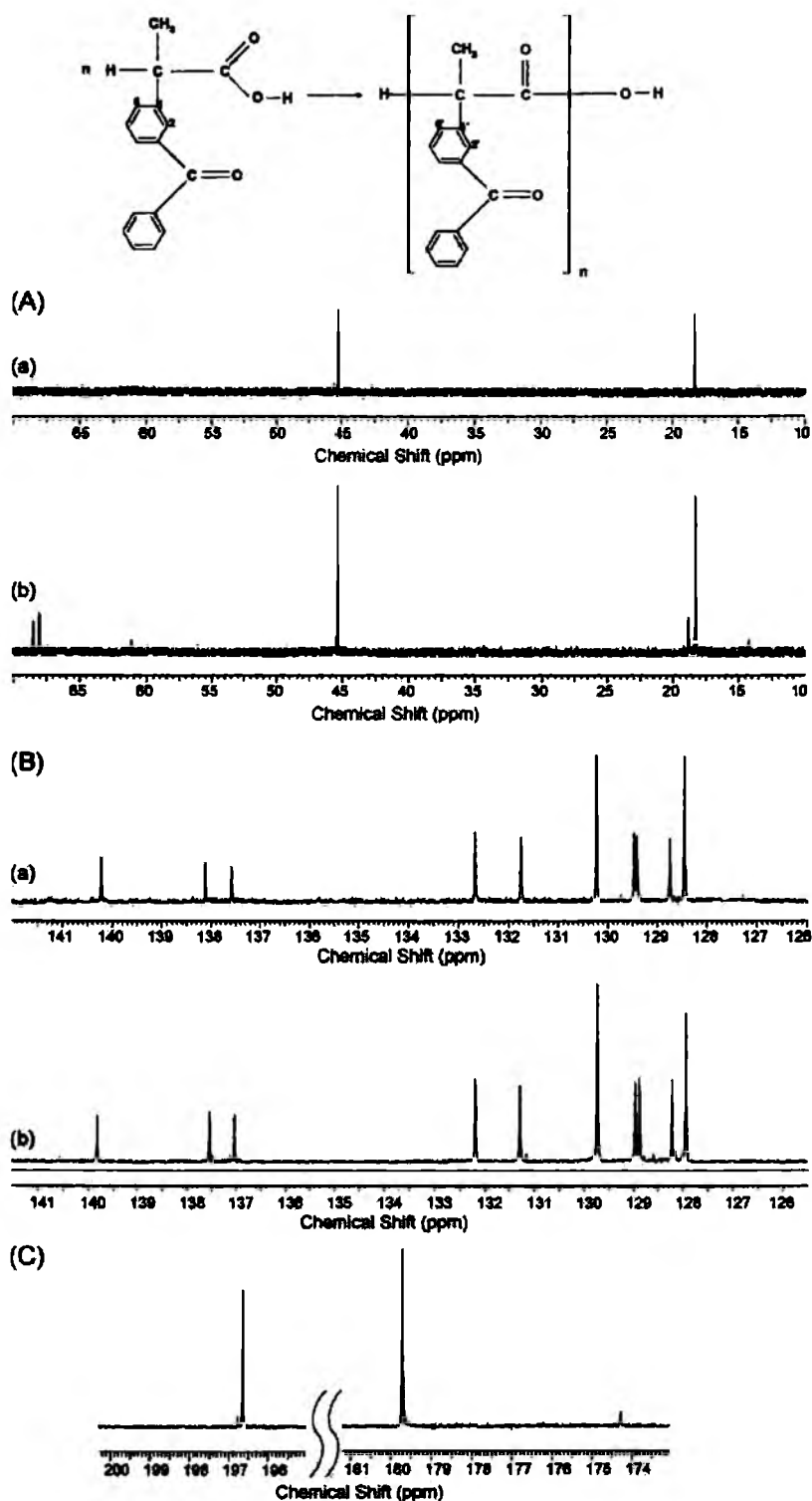


Figure 7. 100 MHz ^{13}C NMR spectra of (a) *S*(+)-ketoprofen monomer and (b) *S*(+)-ketoprofen condensate. *S*(+)-Ketoprofen sample was first dissolved in pure ethanol and then stored in solution for 10 days. Spectra were recorded at 25 °C in CDCl_3 . (A) Aliphatic range. Methyl line at 18.26 ppm in (a) is accompanied by two additional lines at 18.61 and 18.81 ppm in (b), which originate from the methyl groups in the repeating units of the condensate. The signal of the methine carbon at 45.31 ppm in (a) is flanked by a new small line at 45.55 in (b), coming from the end groups. The new lines at 68.03 and 68.51 ppm in (b) originate from new quaternary carbons formed in the main chain of the polymer. (B) Aromatic range. In spectrum (b) two small new peaks appear at 129.09 and 131.65 ppm, respectively, which can be attributed to C-2' and C-6', respectively, in the new molecular environment of ketoprofen condensate (as compared with spectrum (a)). (C) Carbonyl range. After 10 days storage, the carbonyl signal at 179.68 ppm in (a) is flanked by two additional lines, at 174.29 and 196.76 ppm, respectively, in (b).

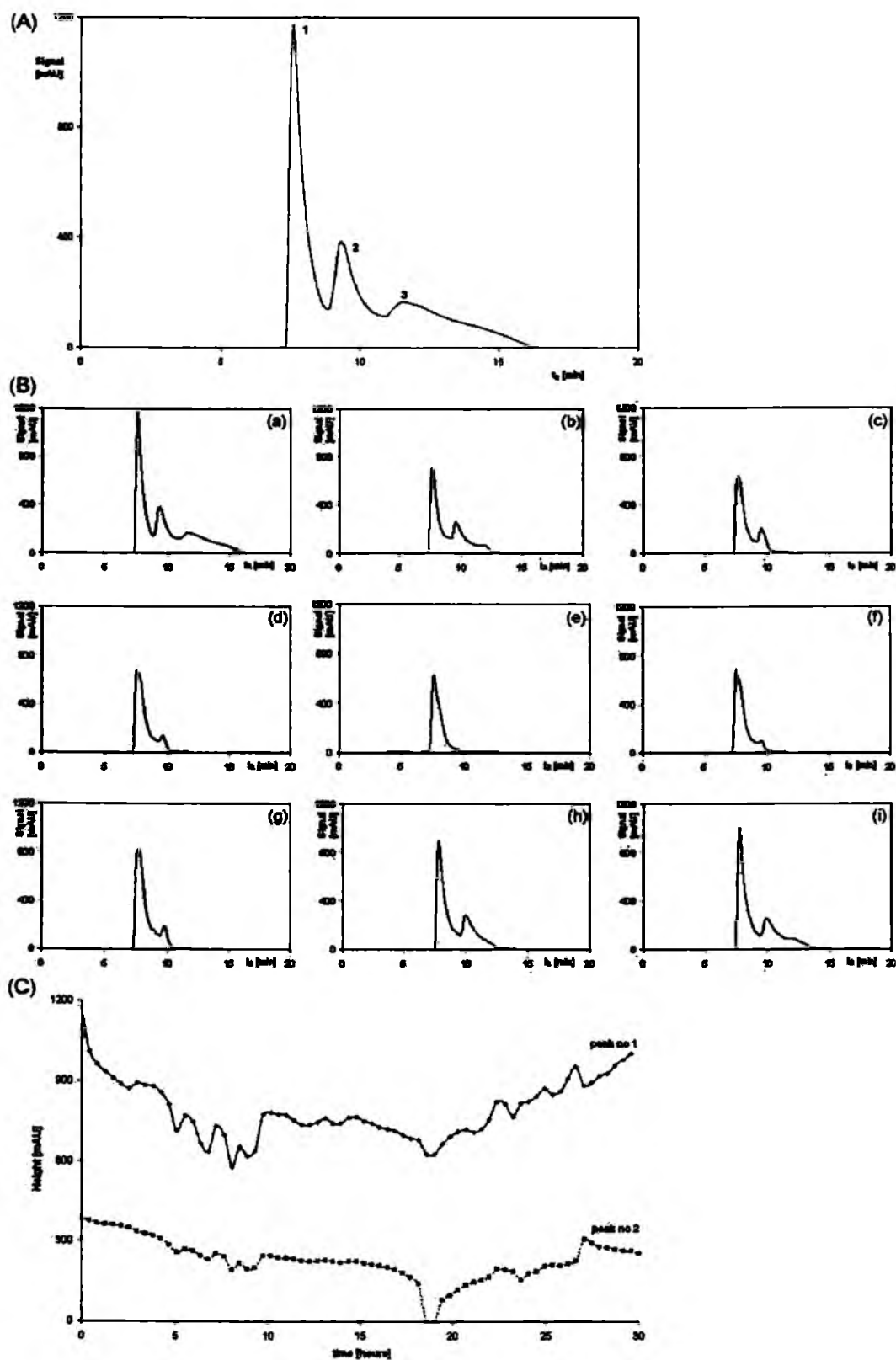


Figure 8. (A) Chromatogram of a freshly prepared solution of *S*(+)-ketoprofen in acrylonitrile recorded at 259 nm. Retention times: peak 1, 7.66 min; peak 2, 9.68 min; peak 3, 11.80 min. (B) Sequence of chromatographic concentration profiles of *S*(+)-ketoprofen dissolved in acetonitrile after (a) 0 h; (b) 5.5 h; (c) 9.5 h; (d) 18 h; (e) 19 h; (f) 20 h; (g) 24.5 h; (h) 28 h; and (i) 30 h storage time at 22 °C. (C) Time course of the chromatographic peak heights of an *S*(+)-ketoprofen solution stored at 22 °C for 30 hours. Peak numbers as in (A)^[19]

from TLC, which emphasizes the utility of this simple analytical technique in tracing the structural lability of organic compounds. Even more relevant to our own research is that the oscillatory condensation documented by these authors involves organosilanols (e.g., $R_2Si(OH)_2$ or $RR'Si(OH)_2$). There are several analogies between the results presented in references^[20,21] and those originating from our own laboratory, and also between the conclusions of the two research teams:

- (i) In selected molecular structures of the relevant organosilanols, the molecular fragment $=Si(OH)_2$ appears^[20,21]. In our study, we postulate the presence of an intermediate enol structure with the analogous molecular fragment $=C(OH)_2$ (see Eqn (1b)).
- (ii) In both studies, condensation of the respective substrates and the spontaneity of this process is well documented.
- (iii) In both cases, condensation takes place in aqueous organic solution.
- (iv) In the condensation of organosilanols, association of the monomers and oligomers is postulated as the key effect responsible for the oscillatory nature of the process. In our model of two linked Templators, the H-bonded homodimers of the carboxylic acids are suggested as templates for chiral conversion (further association of enols with these templates results in a sterically oriented structural change).
- (v) Finally, chirality seems to be a key feature in both processes. In our study, chiral carboxylic acids are the starting material, while with $RR'Si(OH)_2$ organosilanols, oligomeric condensates have asymmetric Si atoms (and the number of these atoms equals the number of coupled monomer units).

Further investigation of oscillatory processes involving simple carboxylic acids occurring spontaneously *in vitro* in abiotic aqueous organic systems seems challenging for both purely scientific reasons and also for practical ones. It seems evident that insufficient attention has so far been paid to *in vitro* studies of structurally simple compounds of high pharmaceutical and/or biochemical importance (profens, amino acids, and hydroxy acids are certainly among such compounds). As a result, processes that run spontaneously in abiotic *in vitro* systems could erroneously be attributed to *in vivo* systems only (as, e.g., in the case of *in vivo* chiral conversion of profen drugs^[22]) and then claimed to be inherent in physiological systems and biochemical processes alone. In that way, misinterpretation of natural processes can easily occur, with serious and potentially negative consequences.

Acknowledgements

This work was supported in part by National Science Foundation grant CHE-0615507 to I.R.E. The work of M.G. and D.K. was

partially supported by PhD scholarships granted to them in 2009 within the framework of the 'University as a Partner of the Economy Based on Science' (UPGOW) project, subsidized by the European Social Fund (EFS) of the European Union.

REFERENCES

- [1] M. Sajewicz, R. Piętko, A. Pieniak, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.* **2005**, *15*, 131–149.
- [2] M. Sajewicz, M. Gontarska, M. Wróbel, T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2007**, *30*, 2193–2208.
- [3] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, Ł. Wojtal, G. Grygierczyk, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.* **2007**, *18*, 227–238.
- [4] M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, T. Kowalska, *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC* **2008**, *21*, 43–47.
- [5] M. Sajewicz, M. Gontarska, Ł. Wojtal, D. Kronenbach, M. Leda, I. R. Epstein, T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2008**, *31*, 1986–2005.
- [6] M. Sajewicz, D. Kronenbach, D. Staszek, M. Wróbel, G. Grygierczyk, T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2008**, *31*, 2006–2018.
- [7] M. Sajewicz, E. John, D. Kronenbach, M. Gontarska, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.* **2008**, *20*, 367–382.
- [8] M. Sajewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, M. Wróbel, R. Piętko, T. Kowalska, *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC* **2009**, *22*, 241–248.
- [9] G. A. Potter, C. Garcia, R. McCague, B. Adger, A. Collet, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 1666–1668.
- [10] P. Belanger, J. G. Atkinson, R. S. Stuart, *J. Chem. Soc. D-Chem. Commun.* **1969**, 1067–1068.
- [11] Y. Xie, H. Liu, J. Chen, *Int. J. Pharm.* **2000**, *196*, 21–226.
- [12] E. Peacock-Lopez, D. B. Radov, C. S. Flesner, *Biophys. Chem.* **1997**, *65*, 171–178.
- [13] L. L. Tsai, G. R. Hutchinson, E. Peacock-Lopez, *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 2003–2006.
- [14] D. G. Blackmond, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 5732–5736.
- [15] R. Plasson, H. Bersini, A. Commeyras, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 16733–16738.
- [16] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.* **2009**, *21*, 151–160.
- [17] M. Sajewicz, M. Matlengiewicz, D. Kronenbach, M. Gontarska, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.* **2009**, *21*, 259–271.
- [18] M. Matlengiewicz, M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.* **2010**, *22*, 81–90.
- [19] M. Sajewicz, M. Gontarska, D. Kronenbach, E. Berry, T. Kowalska, Unpublished results.
- [20] P. V. Ivanov, V. I. Maslova, N. G. Bondareva, O. A. Yur'eva, N. V. Kozlova, E. A. Chernyshev, K. Yu. Odintsov, E. A. Zykunova, *Rus. Chem. Bull.* **1997**, *46*, 2138–2141.
- [21] E. A. Chernyshev, P. V. Ivanov, D. N. Golubikh, *Rus. Chem. Bull.* **2001**, *50*, 1998–2009.
- [22] V. Wsol, L. Skalova, B. Szotakova, *Curr. Drug Metab.* **2004**, *5*, 517–533.

Experimental Investigation of the Oscillatory Transenantiomerization of *L*-Tyrosine

Mieczysław Sajewicz, Dorota Kronenbach,
Dorota Staszek, Magdalena Wróbel, Gabriela
Grygierczyk, and Teresa Kowalska

Institute of Chemistry, University of Silesia, Katowice, Poland

Abstract: In our earlier studies, we demonstrated an ability of selected enantiomeric profen drugs (e.g., *S*-(+)-ibuprofen, *S*-(+)-naproxen, and *S*-(+)- and *R*-(-)-flurbiprofen) and one amino acid (i.e., *L*- α -phenylalanine) to undergo oscillatory transenantiomerization when dissolved in simple, low molecular weight solvents (e.g., water, ethanol, dichloromethane, acetonitrile, etc.) and stored for a longer period of time at ambient temperature or in a refrigerator. Experimental evidence of this process originates from a number of analytical techniques, with thin layer chromatography (TLC) and polarimetry among the best performing ones. There are two common structural features of all these compounds, namely: (i) they are 2-arylpropionic acids (2-APAs), and (ii) their chirality center is located on the α -carbon atom of the respective molecules. It has also been established that the basic and the amphiprotic environment catalyzes the oscillatory transenantiomerization of the investigated compounds, while the acidic environment tends to hamper this process. Moreover, it has been established that all the aforementioned compounds can organize molecules present in the solution in such a manner as to produce the density anisotropy of the liquids considered. Model explanation of the oscillatory transenantiomerization of profens and *L*- α -phenylalanine was also developed as a starting point, adapting an earlier established oscillator known as Templator. The new model comprises two linked Templators. The quintessence of the Templator model adapted to the demands of the oscillatory transenantiomerization of profens and amino acids was based on an assumption

Address correspondence to Teresa Kowalska, Institute of Chemistry, University of Silesia, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland. E-mail: kowalska@us.edu.pl

that the H-bonded 2-APA dimer is a template, able to generate the new dimers having the same steric configuration of their respective monomeric units. From our earlier studies, it clearly comes out that in spite of common traits of the oscillatory transesterification of the selected profens and *L*- α -phenylalanine, the dynamics of this process can significantly differ from one compound to another, due to their differentiated molecular structure and, hence, to the different electron density distribution. Thus, in this study, we investigated the ability of *L*-tyrosine (another 2-APA and the amino acid regarded as essential for the humans) to undergo oscillatory transesterification. Solubility of *L*-tyrosine in the amphiprotic binary mixture (70% aqueous ethanol solution) widely used in our earlier studies proved too low to use it as a solvent in the present investigation. Instead, we traced the behavior of *L*-tyrosine when stored for over one week in the following mixed solvents: ethanol–1M NaOH (7:3, v/v) and ethanol–1M HCl (7:3, v/v). The results of our experiments clearly confirm the ability of *L*-tyrosine to undergo the oscillatory transesterification, similar to that of the previously studied profens and *L*- α -phenylalanine, although the individual dynamics of the oscillatory transesterification with this particular enantiomer is also evident and discussed. It is apparent that the model of the two linked Templators applies to *L*-tyrosine as well, as an adequate explanation of the mechanism of its oscillatory transesterification.

Keywords: Keto-enol tautomerism; *L*-Tyrosine; Oscillatory transesterification; Polarimetry; TLC

INTRODUCTION

In our earlier studies, we have reported on the phenomenon of the oscillatory transesterification of selected profen drugs in aqueous, aqueous-organic, and purely organic solvents.^[1–4] In another paper,^[5] we presented the analogous phenomenon occurring with the dissolved samples of *L*- α -phenylalanine. It is noteworthy that profen drugs and *L*- α -phenylalanine can be ascribed to the same class of chiral 2-arylpropionic acids, with their chirality center located on the α -carbon atom of the respective molecules. This structural similarity seems an important precondition of oscillatory transesterification, with the main feature of the steric conversion summarized with aid of the following equation:



In this earlier paper,^[5] model explanation of the oscillatory transesterification of the profens and amino acids belonging to

the class of 2-APAs was developed, based on the earlier devised model of the oscillatory processes known as Templator.^[6,7] The novel model makes use of the two linked Templators, each one of them describing the different antimer.

In spite of the common structural features, the dynamics of the oscillatory structural conversion of the chiral 2-arylpropionic acids (2-APAs) – due to their differentiated molecular structure and, hence, to the different electron density distribution – must also differ. The present study was focused on checking if *L*-tyrosine (*L*-Tyr) can undergo the oscillatory transenantiomerization according to the following scheme:



And, if so, how this process can be compared with that characteristic of *L*- α -phenylalanine.

EXPERIMENTAL

L-Tyrosine

The chemical structure of *L*-tyrosine is given in Figure 1. In our study, we used *L*-tyrosine purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany; cat. # 1.08371.0025). In the thin-layer chromatographic experiments, we used solutions of *L*-tyrosine in ethanol-1M hydrochloric acid (7:3, v/v) and ethanol-1M sodium hydroxide (7:3, v/v), its concentration always equal to 1 mg mL⁻¹ (i.e., ca. 5.5 × 10⁻³ M). The *L*-tyrosine solutions were stored for 8 days at 22 ± 2°C in order to trace the process of the oscillatory transenantiomerization. In certain time intervals the solution samples were analyzed by means of thin layer chromatography (TLC).

In the polarimetric experiment, we used the analogous two types of the *L*-tyrosine solutions, the amino acid concentration always equal to 50 mg mL⁻¹ (i.e., ca. 2.76 × 10⁻¹ M).

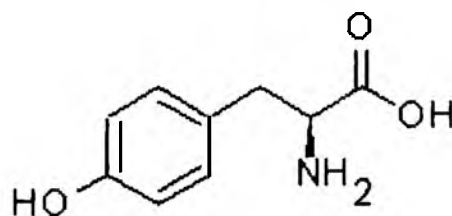


Figure 1. Chemical structure of *L*-tyrosine.

Polarimetric Measurements of the Specific Rotation $[\alpha]_D$

Measurements of the specific rotation ($[\alpha]_D$) of the *L*-tyrosine solutions in the ethanol-1M hydrochloric acid and ethanol-1M hydroxide sodium mixtures were carried out at $9 \pm 2^\circ\text{C}$ and $22 \pm 2^\circ\text{C}$ for 360 min (in 15-min intervals) without and with stirring (by ultrasonification of the measuring cell). Ultrasonification was performed with aid of the Model RK 255H Sonorex Super (Bandelin, Berlin, Germany) ultrasonification bath. Measurements of the specific rotation were carried out with use of a Polamat A polarimeter (manufactured by Carl Zeiss, Jena, Germany). The optical path length of the employed measuring cell was exactly 10 cm (=1 dm), and its volume was ca. 1 mL. Specific rotation $[\alpha]_D$ was calculated, using the following standard equation:

$$[\alpha]_D = 100 \alpha / cd \quad (3)$$

where α is the measured rotation (in the angle degrees); D is the employed wavelength $\lambda = 589 \text{ nm}$, which corresponds with the sodium D line; c is the concentration of a given compound in $\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$ solution; and d is the measured sample thickness in dm.

From the literature,^[8] it is known that the specific rotation ($[\alpha]_D$) of *L*-tyrosine at 20°C equals ca. $-10.0^\circ \div -12.3^\circ$.

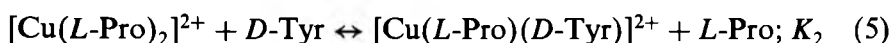
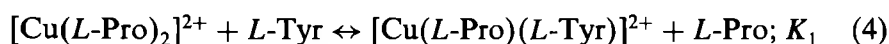
Commercial TLC Silica Gel Layers and their Pretreatment

TLC was performed on commercial glass plates (20 cm \times 20 cm) precoated with 0.25 mm layers of silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, cat. # 1.05715). Before use, the plates were washed by predevelopment with methanol-water, 9:1 (v/v), and then dried at ambient temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) for 3 h.

The washed and dried plates were then twice impregnated by conventional dipping, lasting 2 s each. The first solution used for impregnation was a $2.39 \times 10^{-2} \text{ M L}^{-1}$ aqueous solution of CuSO_4 (analytical grade; manufactured by POCh, Gliwice, Poland). After the first impregnation, the plates were dried for 10 min at $105\text{--}110^\circ\text{C}$ in a thermostatted chamber. The second solution used for impregnation was *L*-proline (*L*-Pro; Merck, cat. # 1.07434.0010) in water – methanol (9:1, v/v), its concentration equal to $3.04 \times 10^{-2} \text{ M}$. It is noteworthy that the molar ratio of the Cu^{2+} cations to the *L*-Pro molecules deposited on the chromatographic plates was equal to 1:2, representing in situ form the $[\text{Cu}(\text{L-Pro})_2]^{2+}$ complex. After the second impregnation, the plates were dried again at ambient temperature for 3 h, after which the impregnated adsorbent layers were ready for chromatography.

Mobile Phase and Development of Thin Layer Chromatograms

Development of the stored *L*-tyrosine samples was carried out at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ for a distance of 15 cm using the ternary mobile phase *n*-butanol (*n*-BuOH)-acetonitrile (ACN)-water (H_2O) (6:2:3, v/v). The anticipated mechanism of retention with each of the two tyrosine antipodes is given below:



Thus, the above mechanism of enantioseparation is known as the ligand exchange chromatography (or complexation chromatography). The TLC procedure employed in this study was adapted from that elaborated by Bhushan et al.^[9] and first described^[5] for the laboratory-coated chromatographic glass plates to use with commercially precoated plates.

Sample application to the plates was with the use of an autosampler (the AS 30 model autosampler manufactured by Desaga, Heidelberg, Germany). The tyrosine solutions were applied to the plate 1.5 cm above the lower edge of the plate in aliquots of $5 \mu\text{L spot}^{-1}$. Nine samples in the equal distance of 2 cm from one another were applied per one plate, and then the chromatogram was developed in the one-dimensional ascending mode. After development, the plates were dried at ambient temperature for 3 h, and each development track was densitometrically scanned in 1-mm intervals at the width of 1 cm in the direction of development. Each experiment was carried out on two plates, thus the numerical results given in this paper originate from 18 individual development lanes.

Densitometric Assessment of the Thin Layer Chromatograms

Densitograms were acquired with a Desaga (Heidelberg, Germany) Model CD 60 densitometer equipped with Windows-compatible ProQuant software. Concentration profiles of the development lanes for α -phenylalanine were recorded in ultraviolet (UV) light from the deuterium lamp (in the reflectance mode) at 200 nm. The dimensions of the rectangular light beam were $2.0 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm}$. The maxima of the concentration profiles were used for calculation of retardation factor (R_F) values.

RESULTS AND DISCUSSION

Thin Layer Chromatography

The aim of the TLC experiment was to gather evidence on the occurrence of the oscillatory transesterification of *L*-tyrosine to its *D* antipode, with the *L*-tyrosine samples dissolved in the two different mixed solvents used in this study [i.e., ethanol – 1 M hydrochloric acid and ethanol – 1 M sodium hydroxide, 7:3 (v/v)], and then stored for eight days at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Unlike our earlier studies on the oscillatory transesterification of the selected profens and *L*-phenylalanine,^[1,5] in this study we could not make use of the ethanol – water (7:3, v/v) mixture because *L*-tyrosine does not dissolve in this neutral solvent. In order to facilitate enantioseparation and to obtain neat Gaussian concentration profiles of the separated analytes, the *L*-tyrosine concentration in the fresh made solutions was purposely low (ca. 5.5×10^{-3} M).

In Figure 2, we show the oscillatory changes of the R_F values with the two different *L*-tyrosine solutions. These oscillatory changes are an important proof of structural conversion of *L*-tyrosine to its *D* antimer, as the investigated amino acid does not decompose under the applied storage conditions and the measuring experimental error of the R_F never surpasses ± 0.02 units. In our experiment, the maximum positions of the tyrosine band oscillate between the R_F values equal to 0.56 ± 0.02 and 0.35 ± 0.02 , as shown in Figure 2.

From the results shown in Figure 2, it is seen that the average R_F values obtained for *L*-tyrosine stored in the ethanol-1 M hydrochloric acid mixture are lower than those for the same amino acid dissolved and stored in the ethanol-1 M sodium hydroxide mixture. This observation

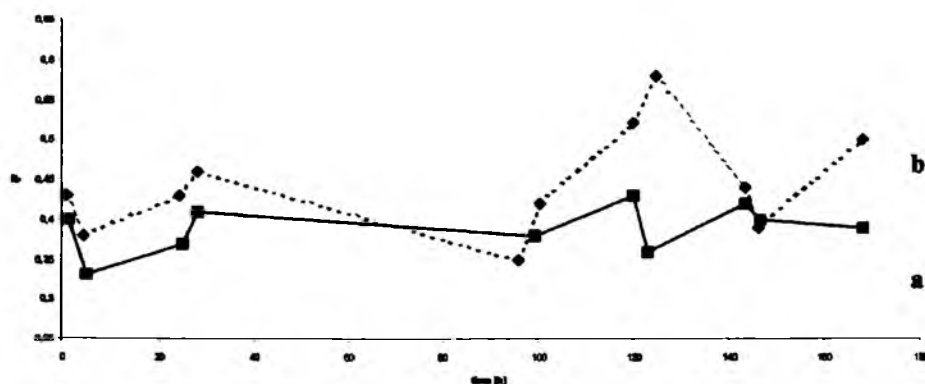


Figure 2. Dependence of retention, R_F , for *L*-tyrosine dissolved in (a) ethanol – 1 M hydrochloric acid, 7:3 (v/v), and (b) ethanol – 1 M sodium hydroxide, 7:3 (v/v) on sample storage time [$R_F = f(t)$] at $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

seems rather striking for the following reason. Attributing the higher R_F value to *L*-tyrosine and the lower one to its *D* antimer (which originates from the findings of Bhushan et al.^[5]) might suggest that in the case of *L*-tyrosine the acidic medium better promotes its transenantiomerization to the *D* species than the basic one. Such a statement seems incorrect in view of basic knowledge on the reaction mechanisms in organic chemistry, of our earlier experience with the spontaneous *in vitro* chiral conversion of 2-APAs, and also in view of the polarimetric results reported in this study. There can be two alternative explanations to this question, which will remain unanswered in this study: (i) either attribution of the lower chromatographic peak to the *D* enantiomer and the higher one to its *L* antipode by Bhushan et al.^[5] was erroneous, or (ii) in the employed chromatographic system *L*-tyrosine dissolved in hydrochloric acid undergoes rapid chiral conversion to *D*-tyrosine, and

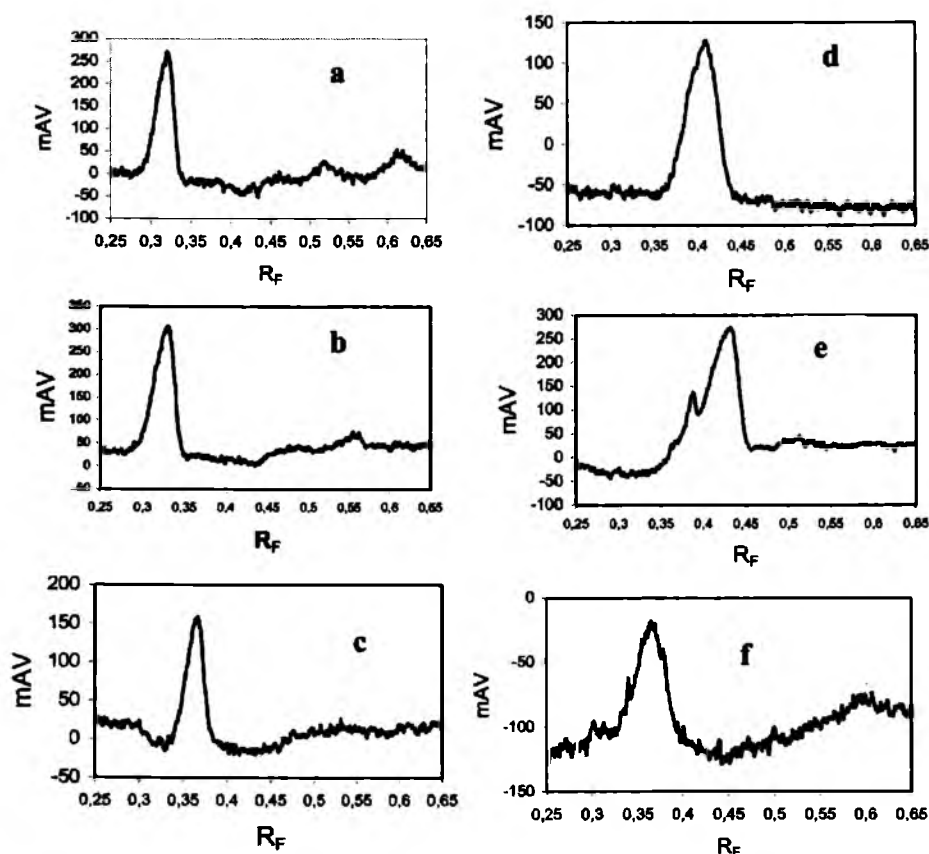


Figure 3. Sequence of densitometric concentration profiles for *L*-tyrosine solution in ethanol – 1 M hydrochloric acid, 7:3 (v/v) after (a) 1.3 h, (b) 5 h, (c) 25 h, (d) 28 h, (e) 120 h, and (f) 123 h storage time at $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

then its chirality is in a rather difficult to understand manner stabilized (which right now seems a less probable case).

An important proof of the oscillatory transesterification of *L*-tyrosine effectively taking place in the reaction medium is not only the changing positions of the maximum of the analyte's concentration profile on the numerical scale of the R_F values, but also the changing shapes of these profiles. These changing maximum positions and shapes of the concentration profiles are presented in the form of a sequence of the individual 'movie pictures' for the sample dissolved in the ethanol-1 M sodium hydrochloric acid mixture [Figures 3(a)–(f)], and in the ethanol-1 M sodium hydroxide mixture [Figures 4(a)–(f)], and then stored for the period of eight days.

In the case of *L*-tyrosine dissolved in ethanol-hydrochloric acid, the obtained 'movie pictures' well show that the oscillation range of the respective R_F values is relatively narrow and the enantioseparation

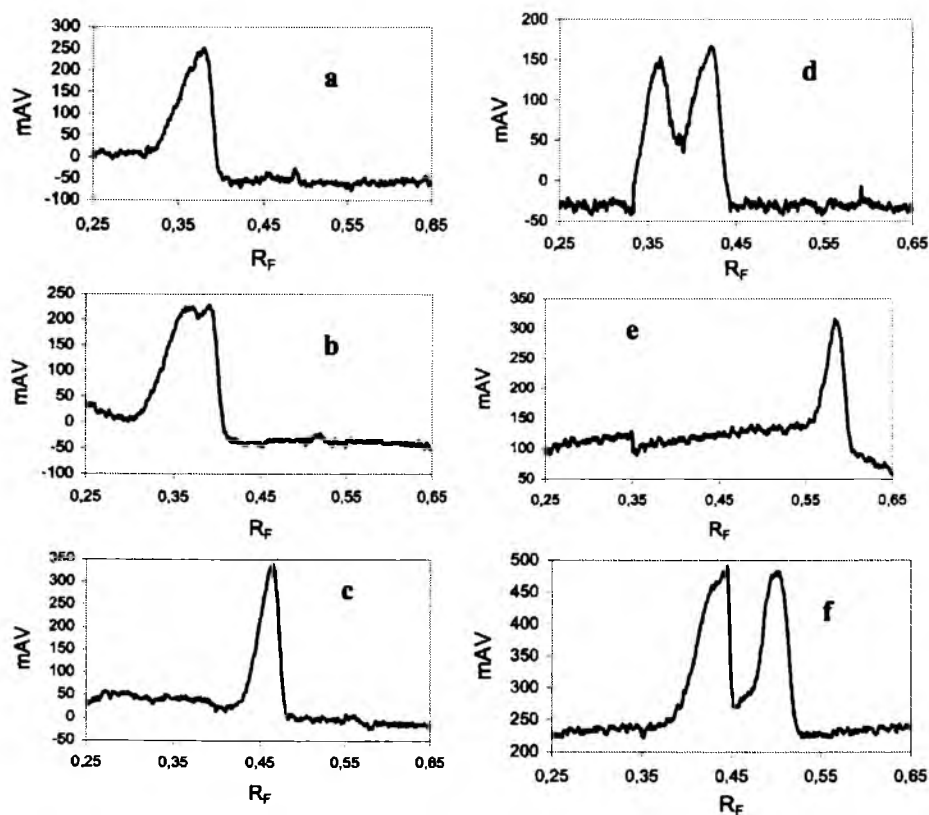


Figure 4. Sequence of densitometric concentration profiles for *L*-tyrosine solution in ethanol – 1 M sodium hydroxide, 7:3 (v/v) after (a) 1 h, (b) 4.6 h, (c) 28 h, (d) 100.5 h, (e) 124.5 h, and (f) 168 h storage time at $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

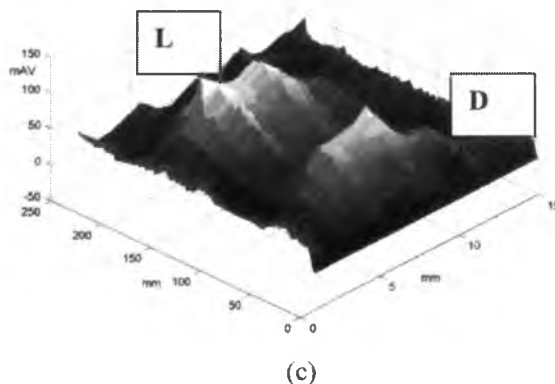
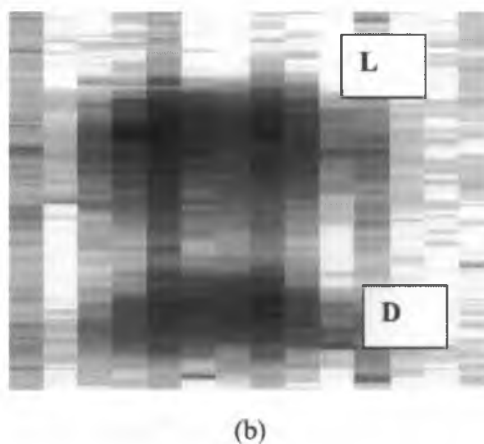
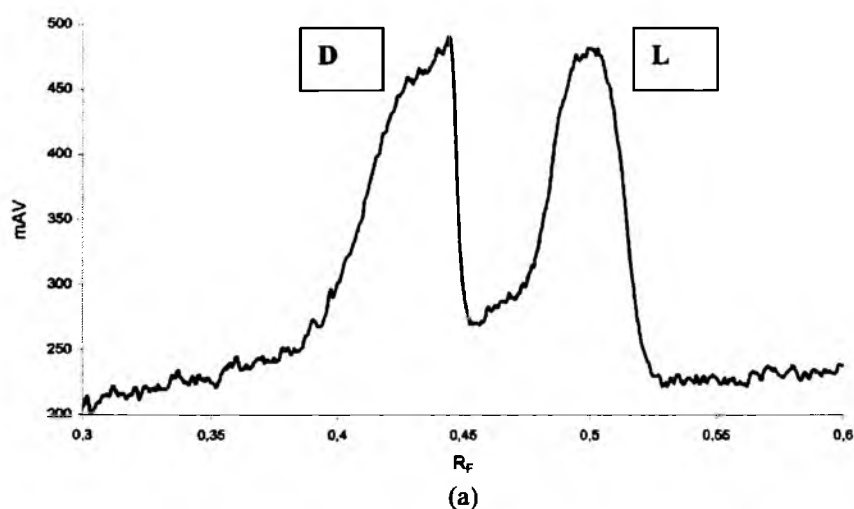


Figure 5. The 1D (densitogram) (a), 2D (b) and 3D (c) representation of the two enantioseparated chromatographic spots of *L*- and *D*-tyrosine after sample storage for 171 h in ethanol – 1 M sodium hydroxide solution (7:3, v/v) at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. The 2D and 3D pictures were drawn upon the densitometric scans of the separated pair of the *L*, *D*-tyrosine antimers taken in 1-mm intervals.

hardly occurs in the period of the 8 day experiment [Figures 3(a)–(f)]. With *L*-tyrosine dissolved in ethanol-sodium hydrochloride, the oscillation range is wider and the comparable quantitative proportions between the two antimers are apparently more frequent, which results in the more frequent cases of quite successful enantioseparations [Figures 4(a)–(f)]. In Figures 5(a)–(c), we present a typical example of enantioseparation of the tyrosine sample stored for a longer period of time (171 h) in the ethanol – 1 M sodium hydroxide solution.

F5

Polarimetry

Specific rotation of *L*-tyrosine in the ethanol-1 M sodium hydroxide and ethanol-1 M hydrochloric acid binary mixtures (with the amino acid concentration always equal to 2.76×10^{-1} M) was measured for 360 min by means of polarimetry at the two different working temperatures, 9 ± 2 and $22 \pm 2^\circ\text{C}$. At each temperature, one sample was kept unstirred and the other was stirred by ultrasonification, in order to additionally investigate the effect of stirring.

At both working temperatures, without and with stirring, the specific rotation values for the *L*-tyrosine solutions were unstable, and they were undergoing the oscillatory changes. However, the amplitude of these oscillations at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ was rather negligible and incomparably lower than at $9 \pm 2^\circ\text{C}$. This effect can most probably be ascribed to the lower viscosity and/or self-organization of the amino acid molecules in the solutions kept at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and, hence, to the less pronounced density anisotropy of the investigated solutions, an important precondition of many chemical oscillatory processes. The results obtained at $9 \pm 2^\circ\text{C}$ are shown in Figures 6(a) and (b). From these plots the following conclusions can be drawn. Firstly, the amplitude of the oscillations with the stirred samples generally matches that of the unstirred samples. However, with *L*-tyrosine dissolved in the basic solvent, the amplitude of the oscillations both with the unstirred and ultrasonificated sample is much lower than that obtained in the analogous experiment with *L*-phenylalanine.^[5] The observed difference is most probably due to the structural difference between these two amino acids, and more specifically due to the presence of an extra hydroxyl group in the molecule of *L*-tyrosine and in its absence in the molecule of *L*-phenylalanine. As *L*-tyrosine contains both the carboxyl and the hydroxyl moiety, it is considerably more apt to participate in intermolecular hydrogen bonding than *L*-phenylalanine. These hydrogen bonds can probably stabilize the electron distribution within the *L*-tyrosine molecules, thus weakening their tendency for chiral conversion.

F6

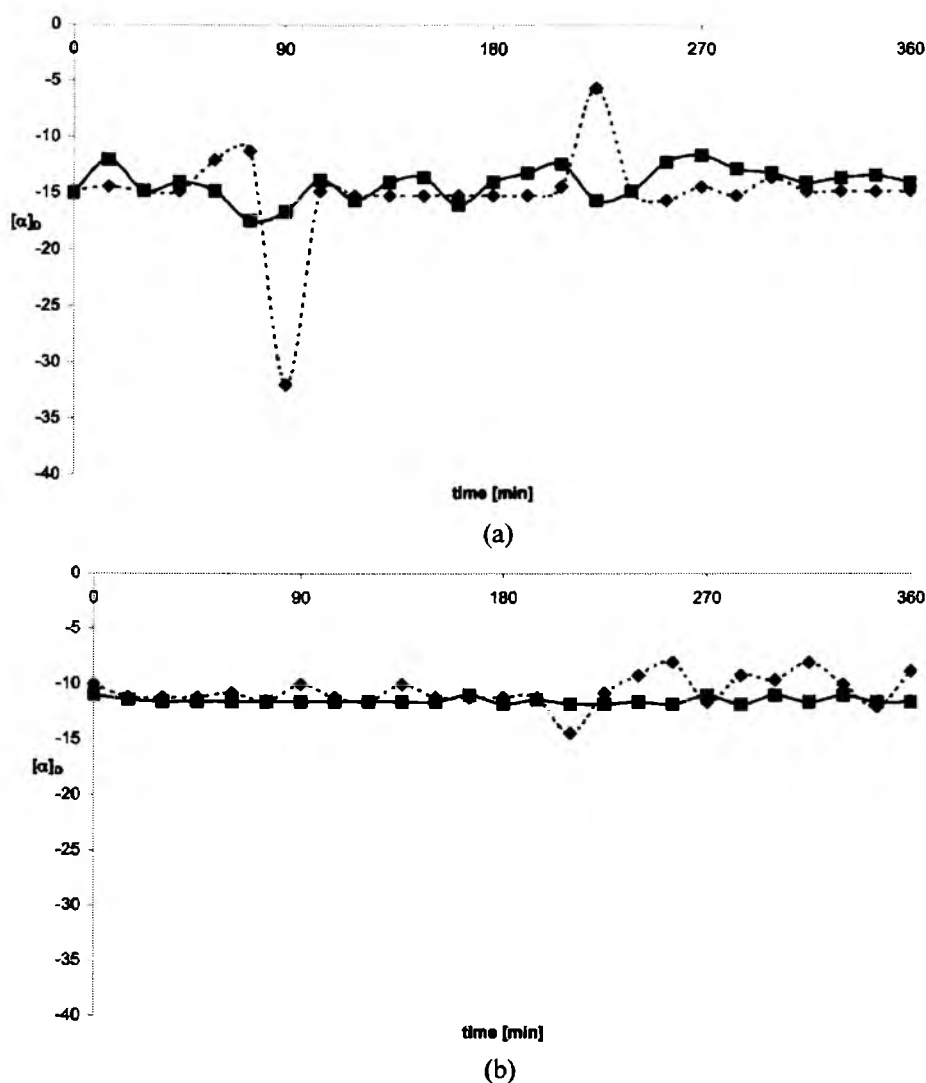


Figure 6. Comparison of the oscillations of the specific rotation value ($[\alpha]_D$) for *L*-tyrosine dissolved and stored for 360 min at $9 \pm 2^\circ\text{C}$ in (a) ethanol – 1 M sodium hydroxide (7:3, v/v), and (b) ethanol – 1 M hydrochloric acid (7:3, v/v), without and with ultrasonification (solid line without ultrasonification; dashed line with ultrasonification).

Secondly, it is evident that the well perceptible amplitude of the oscillations is observed in the basic environment (Figure 6a), and a very modest one only in the acidic medium (Figure 6b). These results well coincide with our earlier findings^[5,10] as to the catalytic role of a basic environment in the oscillatory steric conversion of chiral propionic acid derivatives (most probably running via the keto-enol tautomerism).

Model Explanation of the Oscillatory Transenantiomerization of *L*-Tyrosine

It seems understandable that the model explanation of the oscillatory transenantiomerization of *L*- α -phenylalanine presented earlier^[5] is general enough to adequately explain the case of *L*-tyrosine and its oscillations also. In fact, that theoretical model can be applied to a wide number of the oscillatory chiral inversion cases happening with chiral low molecular weight carboxylic acids, amino acids, and profen drugs.

CONCLUSIONS

(i) The polarimetric results presented in this study are in good agreement with our concept of the keto-enol intermediary step in the oscillatory transenantiomerization of the chiral profens and amino acids from the group of 2-APAs. An assumption of this particular mechanism implies the catalytic effect of a basic environment and the hampering effect of an acidic environment on the investigated transenantiomerization process.

(ii) The thin layer chromatographic results presented in this study point to a more complicated pattern of the tranenantiomerization process in the chromatographic system than that in the bulk liquid phase, illustrated by the oscillations of the specific rotation ($[\alpha]_D$) values. An eloquent indication is that the oscillations of the R_F values are comparable for *L*-tyrosine stored both in the acidic and the basic medium. This is understandable in view of the chromatographic retention effect (i.e., the dynamic intermolecular interactions occurring between the analyte on the one hand and the remaining constituents of the chromatographic system on the other) that perceptibly adds to the overall mechanism of the investigated chiral conversion.

ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to thank Merck KGaA (Darmstadt, Germany) for supplying the TLC plates used in our experiments.

REFERENCES

1. Sajewicz, M.; Piętko, R.; Pieniak, A.; Kowalska, T. Application of thin-layer chromatography (TLC) to investigating oscillatory instability of the selected profen enantiomers. *Acta Chromatogr.* **2005**, *15*, 131–149.

2. Sajewicz, M.; Piętko, R.; Pieniak, A.; Kowalska, T. Application of thin-layer chromatography (TLC) to investigate oscillatory instability of the selected profen enantiomers in dichloromethane. *J. Chromatogr. Sci.* **2005**, *43*, 542–548.
3. Sajewicz, M.; Piętko, R.; Pieniak, A.; Kowalska, T. Application of thin-layer chromatography to the investigation of oscillatory instability of selected profen enantiomers in physiological salt. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **2006**, *29*, 2059–2069.
4. Sajewicz, M.; Gontarska, M.; Kronenbach, D.; Wojtal, Ł.; Grygierczyk, G.; Kowalska, T. A study on the oscillatory in vitro transenantiomerization and enantioseparation of the flurbiprofen antimers by means of thin layer chromatography (TLC). *Acta Chromatogr.* **2007**, *18*, 226–237.
5. Sajewicz, M.; Gontarska, M.; Wojtal, Ł.; Kronenbach, D.; Epstein, I.R.; Kowalska, T. Experimental and model investigation of the oscillatory transenantiomerization of *L*- α -phenylalanine. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **31**, in press. **2008**.
6. Peacock-Lopez, E.; Radov, D.B.; Flesner, C.S. Mixed-mode oscillations in a self-replicating dimerization mechanism. *Biophys. Chem.* **1997**, *65*, 171–178.
7. Tsai, L.L.; Hutchinson, G.R.; Peacock-Lopez, E. Turing patterns in a self-replicating mechanism with a self-complementary template. *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 2003–2006.
8. Virtual catalog of ScienceLab.com (<http://sciencelab.com/>)
9. Bhushan, R.; Reddy, G.P.; Joshi, S. TLC resolution of DL amino acids on impregnated silica gel plates. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC.* **1994**, *7*, 126–128.
10. Sajewicz, M.; Piętko, R.; Drabik, G.; Kowalska, T. On the mechanism of oscillatory changes of the retardation factor (R_F) and the specific rotation $[\alpha]_D$ with selected solutions of *S*-(+)-naproxen. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **2006**, *29*, 2071–2082.

Received October 24, 2007

Accepted November 21, 2007

Manuscript 6311C

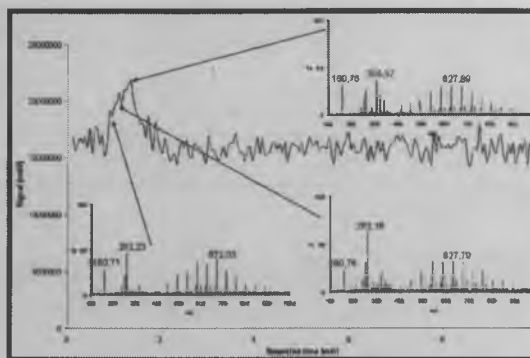
Oligomerization Oscillations of L-Lactic Acid in Solution

Mieczysław Sajewicz,[†] Miloš Dolnik,[‡] Dorota Kronenbach,[†] Monika Gontarska,[†] Teresa Kowalska,[†] and Irving R. Epstein^{*,‡}

[†]Institute of Chemistry, University of Silesia, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland

[‡]Department of Chemistry, MS 015, Brandeis University, Waltham, Massachusetts 02454-9110, United States

ABSTRACT: We employ high-performance liquid chromatography with diode array, evaporative light scattering, and mass spectrometric detection to monitor the oligomerization of L-lactic acid in pure acetonitrile and in 70% aqueous ethanol. The production of higher oligomers appears to proceed in an oscillatory fashion. A model is presented that involves the formation of aggregates (micelles), which catalyze the oligomerization.



INTRODUCTION

Low molecular weight profen drugs, amino acids, and hydroxy acids exhibit spontaneous in vitro oscillatory chiral conversion under appropriate conditions.¹ However, monitoring oscillatory chemical reactions in colorless organic solutions is a challenging experimental task. High-performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detection (HPLC-DAD) is a promising tool to follow such phenomena when there are UV-absorbing species present. A bottleneck of the chromatographic approach is the time needed for a single analytical run, which makes continuous measurement of the relevant concentration changes virtually impossible, even if an autosampling device is available. One way to ameliorate this drawback is to minimize the time for a single analytical run, in that way obtaining a more nearly continuous series of quantitative results. Such an approach has been employed² to study the oscillatory oligomerization of *S*(-)-ketoprofen based on HPLC data collected at 25 min intervals.

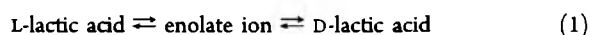
Detailed liquid chromatographic and mass spectrometric evidence has been presented for the spontaneous oscillatory peptidization of *S*-, *R*-, and *rac*-phenylglycine dissolved in 70% aqueous ethanol and stored for lengthy intervals.³ Crude theoretical models have been proposed for these phenomena.^{1,3}

L-Lactic acid is a compound of particular interest because of its biological importance. In humans and animals, the L-lactate ion is produced from the pyruvate ion through the enzymatic action of lactate dehydrogenase (LDH). It serves as a key intersection of several metabolic pathways that include carbohydrate digestion and energy transport to living cells.⁴ It is also produced on a large scale in industrial fermentation processes performed, e.g., by *Lactobacillus* bacteria.⁵

Despite the key role played by L-lactic acid in many biological systems, there have been only a handful of studies of its ability to

undergo a spontaneous oscillatory in vitro chiral conversion.^{6,7} Lactic acid is poorly retained in HPLC systems⁸ and thereby causes considerable analytical difficulties. To solve this problem, an alternative enantioseparation method has been developed.⁹ A thin-layer chromatographic method is also available.¹⁰ More detailed investigation of the possibility that L-lactic acid can undergo spontaneous in vitro oscillatory oligomerization in either aqueous or nonaqueous solutions is clearly desirable.

Our earlier studies^{1–3} demonstrate that the spontaneous oscillatory oligomerization of low molecular weight carboxylic acids is often accompanied by oscillatory chiral conversion. In aqueous media, the conversion mechanism can be schematically described as¹¹



In anhydrous media and in the presence of trace amounts of water, the probable mechanism of chiral conversion is¹²



In this study, we present high-performance liquid chromatographic and mass spectroscopic experiments on the chemical transformations of L-lactic acid dissolved either in 70% aqueous ethanol or in pure acetonitrile. In order to gain deeper insight into the nature of these processes, we employ HPLC with three different detection methods: diode array (DAD), evaporative light scattering (ELSD), and mass spectrometric (MS) detection. Finally, we propose a theoretical model to describe the observed phenomena.

Received: July 22, 2011

Revised: September 29, 2011

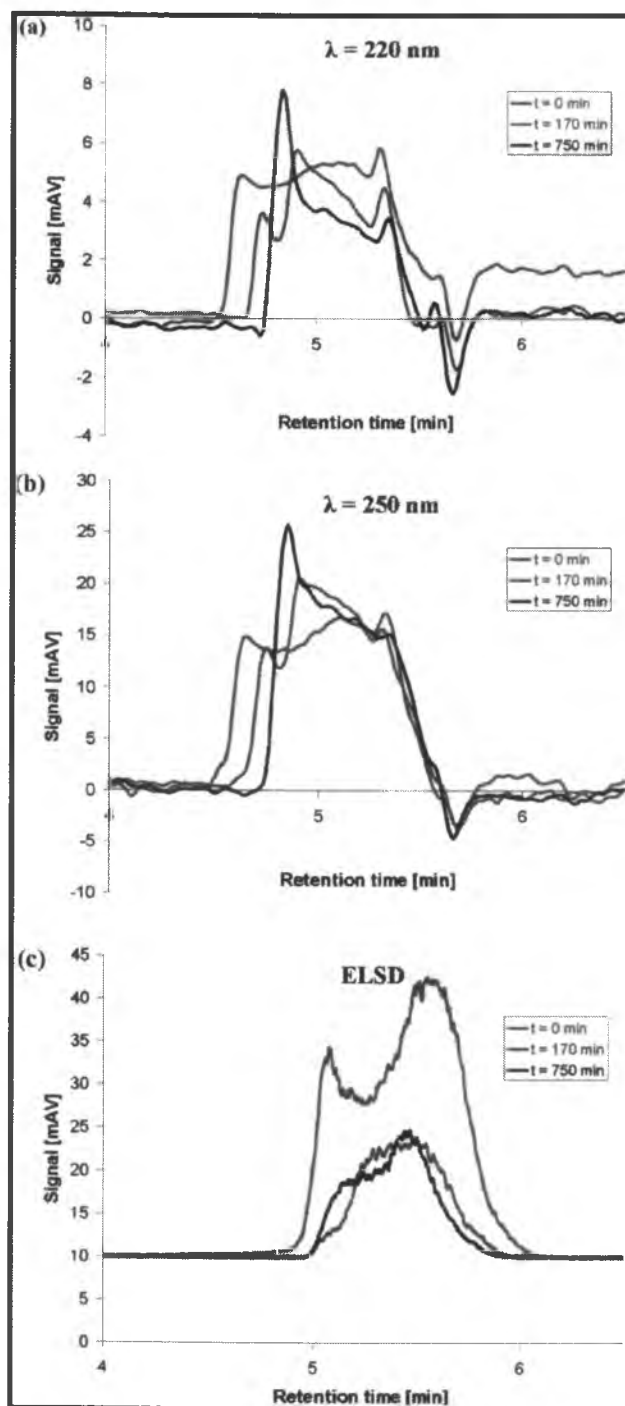


Figure 1. Sequences of three chromatographic concentration profiles of L-lactic acid in ACN registered at 22 °C after 0, 170, and 750 min with the DAD detector at (a) 220 nm and (b) 250 nm and (c) with the ELSD detector.

EXPERIMENTAL SECTION

Reagents. Analytical grade L-lactic acid (LA) was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland; cat. #69771). For the spontaneous condensation experiments, 2.00 g L^{-1} ($2.22 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) of LA was dissolved in acetonitrile (ACN) or in 70% aqueous

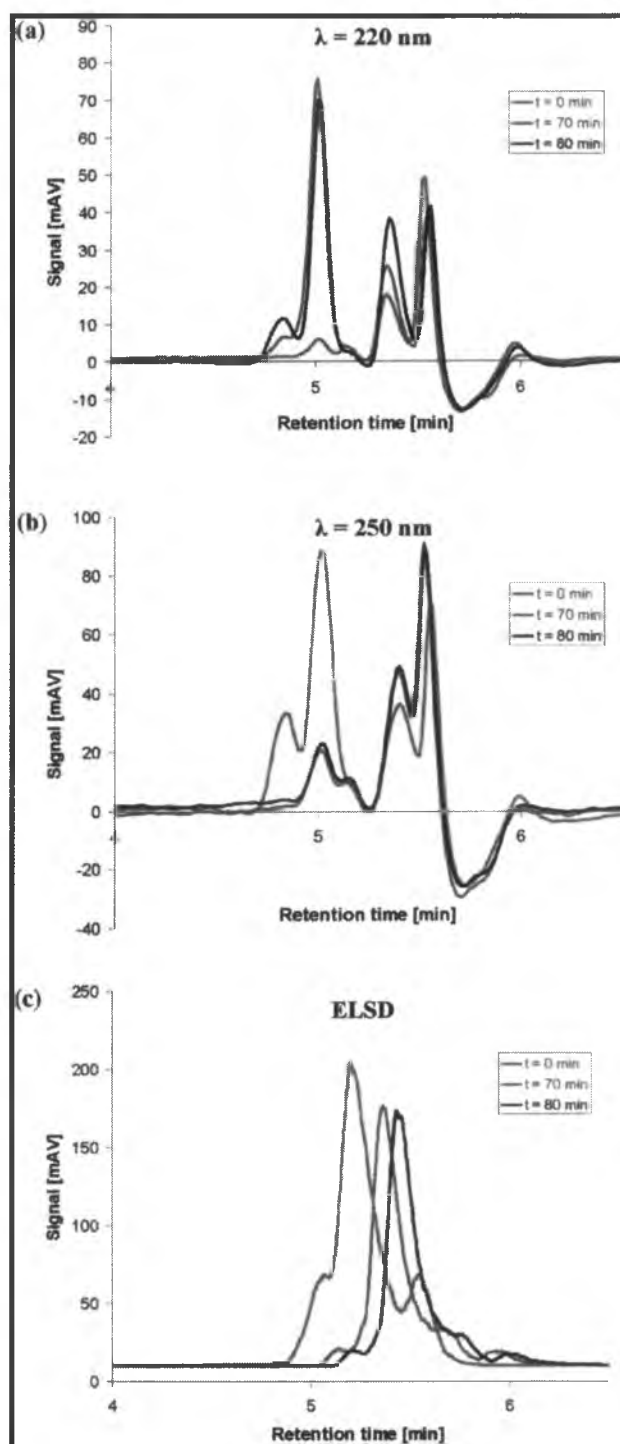


Figure 2. Sequences of three chromatographic concentration profiles of L-lactic acid in 70% EtOH registered at 22 °C after 0, 70, and 80 min with the DAD detector at (a) 220 nm and (b) 250 nm and (c) with the ELSD detector.

ethanol (EtOH). Both solvents were HPLC purity grade (Merck, Darmstadt, Germany); water was double distilled and deionized (Elix Advantage model Millipore system; Molsheim, France). Samples were stored in tightly stoppered colorless glass vials and

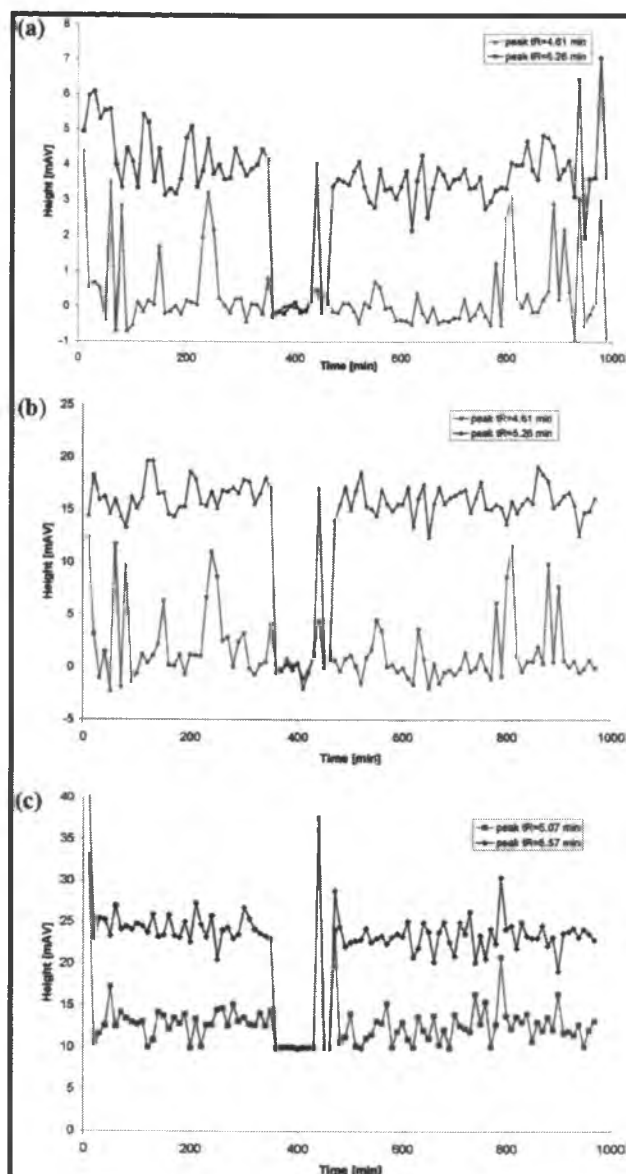


Figure 3. Time series of chromatographic peak heights for L-lactic acid in ACN at 22 °C. (a) DAD detector at $\lambda = 220$ nm; (b) DAD detector at $\lambda = 250$ nm; and (c) ELSD detector. Plots in a and b are for peaks at $t_R = 4.61$ and 5.26 min; plots in c are for the peaks at $t_R = 5.07$ and 5.57 min.

allowed to age for 980 min (ACN) or 400 min (70% EtOH) at 22 °C.

High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection (HPLC-DAD) and Evaporative Light-Scattering Detection (HPLC-ELSD). High-performance liquid chromatographic analysis was carried out using a Varian model 920 liquid chromatograph (Varian, Harbor City, CA, USA) equipped with a Varian model 900-LC autosampler, a gradient pump, a Varian model 330 DAD detector, a Varian model 380-LC ELSD detector, and Galaxie software for data acquisition and processing. The analyses were performed on 20 μ L aliquots of the L-lactic acid solutions in the isocratic mode, using a Pursuit 5 C18 (5 μ m particle size) column (250 mm \times 4.6 mm i.d.; Varian, Harbor City, CA, USA; cat. no. A3000250C046) with a methanol–water (5:5, v/v)

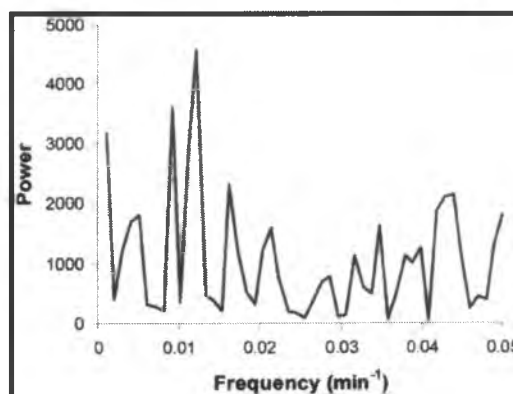


Figure 4. Power spectrum calculated from the time series of chromatographic peak heights for L-lactic acid in ACN registered with the DAD detector at $\lambda = 250$ nm and $t_R = 4.61$ min.

mobile phase at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. The chromatographic column was thermostatted at 30 °C with a Varian Pro Star 510 column oven. These analyses were done at 10 min intervals for 980 min (ACN) and 400 min (70% EtOH), respectively.

High-Performance Liquid Chromatography with Mass Spectrometric Detection (LC-MS). Liquid chromatographic analysis with mass spectrometric detection (LC-MS) was carried out using an LC-MS System (Varian, Palo Alto, CA, USA) equipped with a Varian ProStar pump, Varian 100-MS mass spectrometer, and Varian MS Workstation, v. 6.9.1, software for data acquisition and processing.

The LC analyses were performed on 20 μ L aliquots of the L-lactic acid solutions in the isocratic mode, using a Pursuit X R_s 3-C18 column (50 mm \times 2.0 mm i.d.; Merck KGaA, Darmstadt, Germany; cat. no. A6001050C020) and a methanol–water (5:5, v/v) mobile phase at a flow rate of 0.20 mL min⁻¹.

Mass spectrometric detection was carried out in the electrospray ionization (ESI) mode (full ESI-MS scan, positive ionization, spray chamber temperature 45 °C, drying gas temperature 200 °C, drying gas pressure 25 psi, capillary voltage 70 V, and needle voltage 5 kV).

RESULTS

HPLC-DAD and HPLC-ELSD. In Figure 1, we present chromatograms of lactic acid dissolved in pure ACN, registered for the freshly prepared sample and after 170 and 750 min. These chromatograms were recorded with the DAD and ELSD detectors. In Figure 2, we give analogous results for lactic acid dissolved in 70% EtOH. In the second case, we show chromatograms of the freshly prepared sample and at 70 and 80 min. With 70% aqueous ethanol as the solvent, satisfactory (although not always baseline) separations were obtained (Figure 2) with the peaks for which the oscillatory plots were drawn. Thus, the chromatographic peak heights were considered to be proportional to the respective concentrations. With ACN as the solvent, for the sake of comparison we employed the same chromatogram registration time of 10 min and the same chromatographic system as in the case of 70% aqueous ethanol. These conditions did not allow full separation of the various oligomeric species. In this case, the time course of the peak heights was monitored only for the two peaks for which the respective maxima were clearly separable in the chromatographic profiles.

In order to probe in as much detail as possible of the evolution of the concentration profiles (fingerprints) of our samples, we employ two UV wavelengths ($\lambda = 220$ and 250 nm) with the DAD detector as well as utilizing ELSD detection. The fingerprints found in the ACN solution differ significantly from those seen in the 70% EtOH solution. The observed dissimilarities presumably arise from differences between the ability of ACN and of EtOH/H₂O to participate in hydrogen bonding with lactic acid. Because of the greater tendency of 70% EtOH to form H-bonded aggregates with LA, the concentration profiles found in this solvent exhibit more and much better resolved peaks attributable to oligomerization products than in ACN.

In order to visualize the evolution of a solution of lactic acid in ACN, we plot the peak heights for the two peaks with distinct maxima (even if not fully resolved) against the time after the preparation of the sample in Figure 3a–c. The plots in Figure 3a,b show the peak heights at retention times (t_R) of 4.61 and 5.26 min, as recorded with the DAD detector at 220 and 250 nm. The corresponding plots at $t_R = 5.07$ and 5.57 min are shown in Figure 3c. In all cases, we observe irregular, low amplitude oscillations in the respective concentrations.

The signal corresponding to the peaks in Figure 3a–c at retention time $t_R = 5.26$ min (DAD) and $t_R = 5.57$ min (ELSD) undergoes a sharp drop in height and in the amplitude of its oscillation between about 360 and 460 min. We attribute this phenomenon to the temporary disappearance of the corresponding oligomerization product in the reaction medium, either due to the dissociation of this oligomer to a lower species or due to its consumption to produce a higher species. Similar phenomena have been observed in the analogous studies of the oscillatory polycondensation of *S*(+)-ketoprofen (ref 2; Figure 3) and the oscillatory peptidization of *L*-phenylglycine and *L*-phenylalanine (unpublished results).

To assess whether our signals contain a significant periodic component, we Fourier transform the data in Figure 3 and calculate the corresponding power spectra. All the power spectra contain a large peak at zero frequency, which we remove from our plots. In Figure 4, we show as an example the power spectrum calculated from the data for the peak at $t_R = 4.61$ and $\lambda = 250$ nm (Figure 3b). The two highest peaks in this power spectrum appear at frequencies just below and above 0.01 min^{-1} , implying a periodicity of ca. 100 min.

Analogous results for lactic acid dissolved in 70% EtOH are given in Figure 5a–c. In this case, the peaks of the separated oligomers are much better resolved than in the ACN solution, and thus, the heights are nearly uncontaminated by peak overlap. Hence, they can be considered as proportional to the concentrations of distinct species. Examples of the corresponding power spectra calculated from these chromatographic data are shown in Figure 6a–d. The highest peak in Figure 6a occurs at 0.035 min^{-1} . This frequency roughly corresponds to a periodicity of 30 min, which can be seen in the peak height data at $t_R = 5.36$ min in Figure 5b. The power spectrum for the peak at $t_R = 5.53$ min (Figure 6b) also displays a maximum at 0.035 min^{-1} , though the highest peak in this plot is located at 0.005 min^{-1} . Figure 6c,d also show peaks at a frequency ca. 0.035 min^{-1} .

The results obtained with the ELSD detector (Figures 3c and 5c) should be a somewhat better indicator of the dynamics of the system than the DAD data. ELSD is a universal detector that is sensitive to all analytes present, with a response proportional to their molecular weights. DAD generally requires UV light absorption, and lactic acid and its likely aggregation products are largely

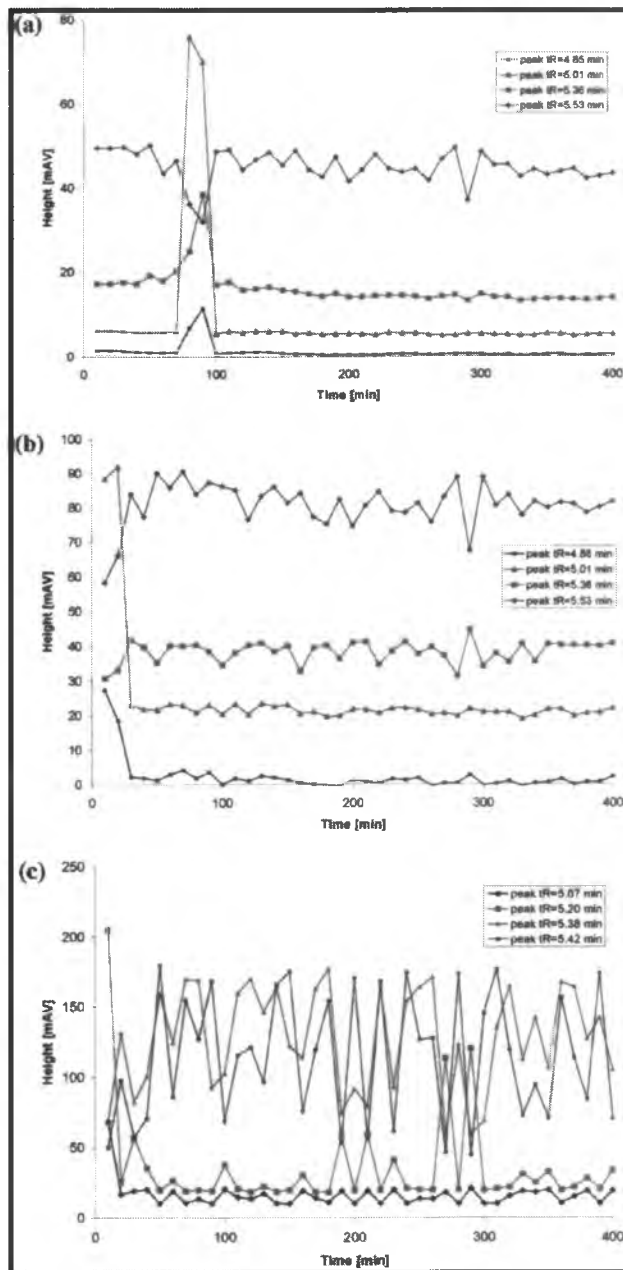


Figure 5. Time series of chromatographic peak heights for *L*-lactic acid in 70% EtOH at 22 °C. for 400 min. (a) DAD detector at $\lambda = 220$ nm; (b) DAD detector at $\lambda = 250$ nm; and (c) ELSD detector. Plots in a and b are for peaks at $t_R = 4.85, 5.01, 5.36$, and 5.53 min; plots in c are for $t_R = 5.07, 5.20, 5.38$, and 5.42 min.

lacking in UV-absorbing chromophores, though the DAD detector may also respond to differences in the refractive index of the compounds in the effluent.

In Figure 7, we present spectrochromatograms of freshly prepared samples of lactic acid in ACN and 70% EtOH (Figure 7a,c, respectively) and also after 980 min in ACN (Figure 7b) and 400 min in 70% EtOH (Figure 7d). These figures give evidence of significant changes in the composition of the solutions after several hours. In the 70% EtOH sample, we easily identify a

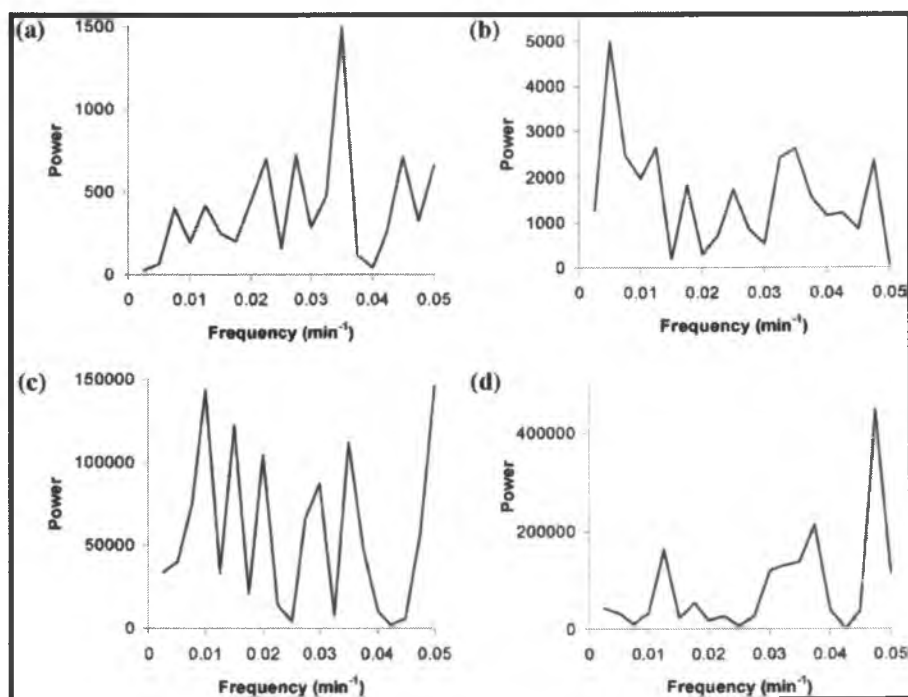


Figure 6. Power spectra calculated from the time series of chromatographic peak heights for L-lactic acid in 70% aqueous EtOH. (a,b) DAD detector at $\lambda = 250$ nm and (c,d) ELSD detector; $t_R =$ (a) 5.36 min, (b) 5.53 min, (c) 5.38, and (d) 5.42 min.

pronounced growth of one or more species with increased retention times and hence higher molecular weights.

LC-MS. Combining liquid chromatography with mass spectrometry provides an independent method to monitor the processes of interest. We first performed initial separations of freshly prepared and aged samples on an LC column. We then recorded the mass spectra of the column effluents. The respective chromatograms are shown in Figure 8a–d. For each chromatogram, insets show the mass spectra of the effluents corresponding to the key peaks.

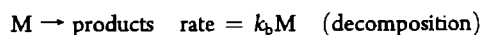
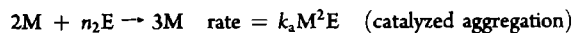
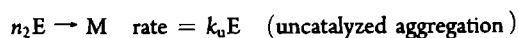
With the fresh lactic acid sample in ACN (Figure 8a), there is only one major peak in the chromatogram. The predominant signal in the corresponding mass spectrum is at m/z 258.34, which is consistent with the following structure: [LA trimer + Na + He] $^+$. This m/z 258.34 signal is essentially absent in the effluents collected after 980 min (Figure 8b). In that case, however, in each mass spectrum a characteristic group of signals can be seen with the distribution of percent yields resembling a normal distribution centered around m/z 627. This signal is consistent with the structure [LA octamer + Na + He] $^+$.

The concentration profile of the fresh lactic acid sample in 70% EtOH (Figure 8c) is richer than that of the analogous sample prepared in ACN. We attribute the greater variety of entities present to the increased capacity for hydrogen bonding between the lactic acid species and the EtOH and H₂O in the solution. Nevertheless, the mass spectra corresponding to the highest peaks in this chromatogram are relatively simple and quite similar to one another. The predominant signals in the three recorded mass spectra are at m/z 306 or 319. The signal at m/z 306 corresponds to an LA tetramer. Mass spectra recorded after 400 min (Figure 8d) suggest a greater abundance of higher aggregation products than in the fresh sample. Again, in each mass spectrum a characteristic group of signals can be seen with a near-normal distribution of percentage yields and centered at m/z values between 650 and

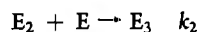
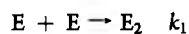
800. There are also significant low-level signals at m/z values above 1000.

Thus, all three techniques employed, HPLC-DAD, HPLC-ELSD, and LC-MS, point to the spontaneous oscillatory oligomerization of L-lactic acid in both an aqueous (70% EtOH) and a nonaqueous (ACN) solvent.

Theoretical Model. In an effort to gain a further understanding of our experimental results, we constructed a model of an oscillatory oligomerization process. The model contains only three species: a precursor, P (e.g., lactic acid), a short oligomer, E, derived from the precursor, and an aggregate (possibly a micelle), M, that is formed from several molecules of E. The key assumption is that M can form either via an uncatalyzed pathway or by an autocatalytic pathway in which M serves as a template for the formation of more M. The reactions are



A more detailed model would contain a sequence of aggregation steps of the form¹³



...



and similarly for the formation of E from P.

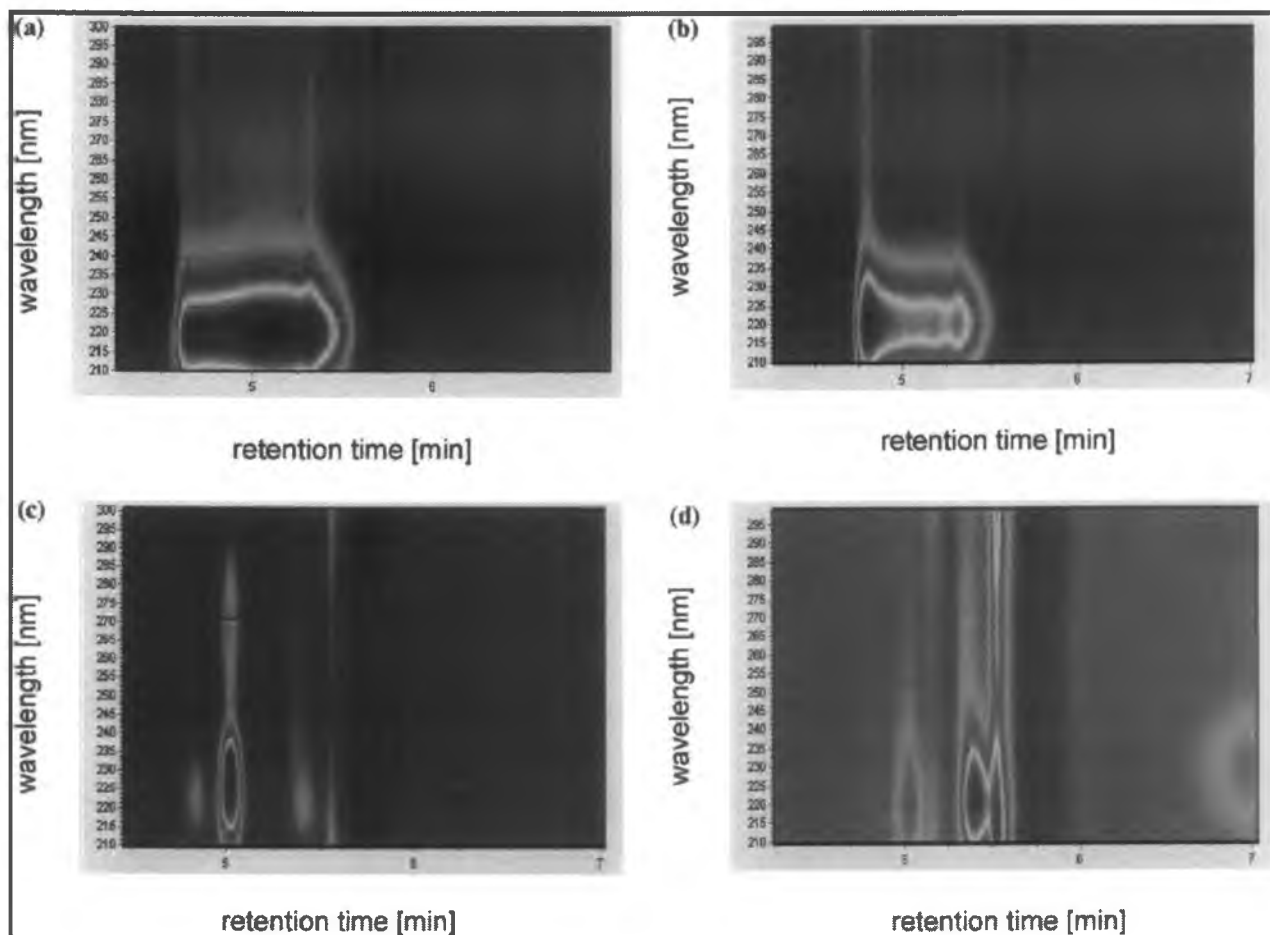


Figure 7. Spectrochromatograms of L-lactic acid solution registered with the DAD detector after (a) 0 min and (b) 980 min storage in ACN and after (c) 0 min and (d) 400 min storage in 70% EtOH; $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$. The colors represent peak heights; red corresponds to the highest peaks, blue to the lowest.

Since we have no information about the individual aggregation rate constants, we instead employ a coarse-graining process analogous to that proposed by Coveney and Wattis¹⁴ and group these steps into a single aggregation step with an effective aggregation number, n_2 , and an effective rate constant, k_a . We adopt a similar approach to the formation of the reactive species, E , where n_1 might be 1 if a rate-determining enolization suffices to activate the molecules for further rapid aggregation, $n_1 = 2$ if dimerization is required, etc. Again, if $n_1 > 2$, the model equation is presumed to capture a sequence of initiation processes. The model, which is equivalent to the Gray–Scott model with precursor decay¹⁵ augmented with the coarse-graining parameters n_1 and n_2 , gives oscillations with values of n_1 at least as high as 20 and with $1 \leq n_2 \leq 8$. The number of oscillations decreases with both increasing n_1 and n_2 , i.e., oscillations are more robust with smaller aggregates. In Figure 9, we show a simulation with $n_1 = 5$ and $n_2 = 8$. The amplitude (about 1.4 mmol/L) and period (about 30 min) of the oscillations are in reasonable agreement with our experiments.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

We have employed a variety of chromatographic techniques to demonstrate that L-lactic acid generates higher oligomers during prolonged storage in both aqueous and nonaqueous media. This oligomerization process takes place in an irregular, oscillatory

fashion. The key biological role played by lactic acid and its derivatives lends significance to these observations, though it is difficult to extrapolate the present results to physiological conditions. We note that similar phenomena have been observed in an amino acid, phenylglycine.³ We propose a simple model involving activation/oligomerization of the monomer followed by aggregation of oligomers to form a micelle or similar species. This aggregate then serves as a template for further aggregation. Such a scheme, perhaps augmented by surface-assisted aggregation and/or catalysis, might be helpful in understanding the origins of some of the earliest biomolecules.

We note that the data that we have presented are quite noisy and irregular and that, at least in the case of ACN, the chromatographic peaks are not sufficiently well separated to allow for identification of individual peaks with particular molecular species. What we can say definitively is that the observed oscillations of the peak heights result from chemical processes in the samples rather than from experimental noise. To confirm this, we carried out analogous measurements under similar conditions on stable analytes that do not undergo any structural transformation such as chiral inversion and/or oligomerization. In these control experiments, all samples showed (constant) peak height reproducibility of $\pm 3\%$ relative error or better, a deviation considerably smaller than the variations observed in our lactic acid samples. Also, even

if our inability to resolve the peaks means that some peaks may have contributions from more than one species, the long duration of the oscillations implies that at least one species in each oscillatory peak must exhibit oscillatory behavior.

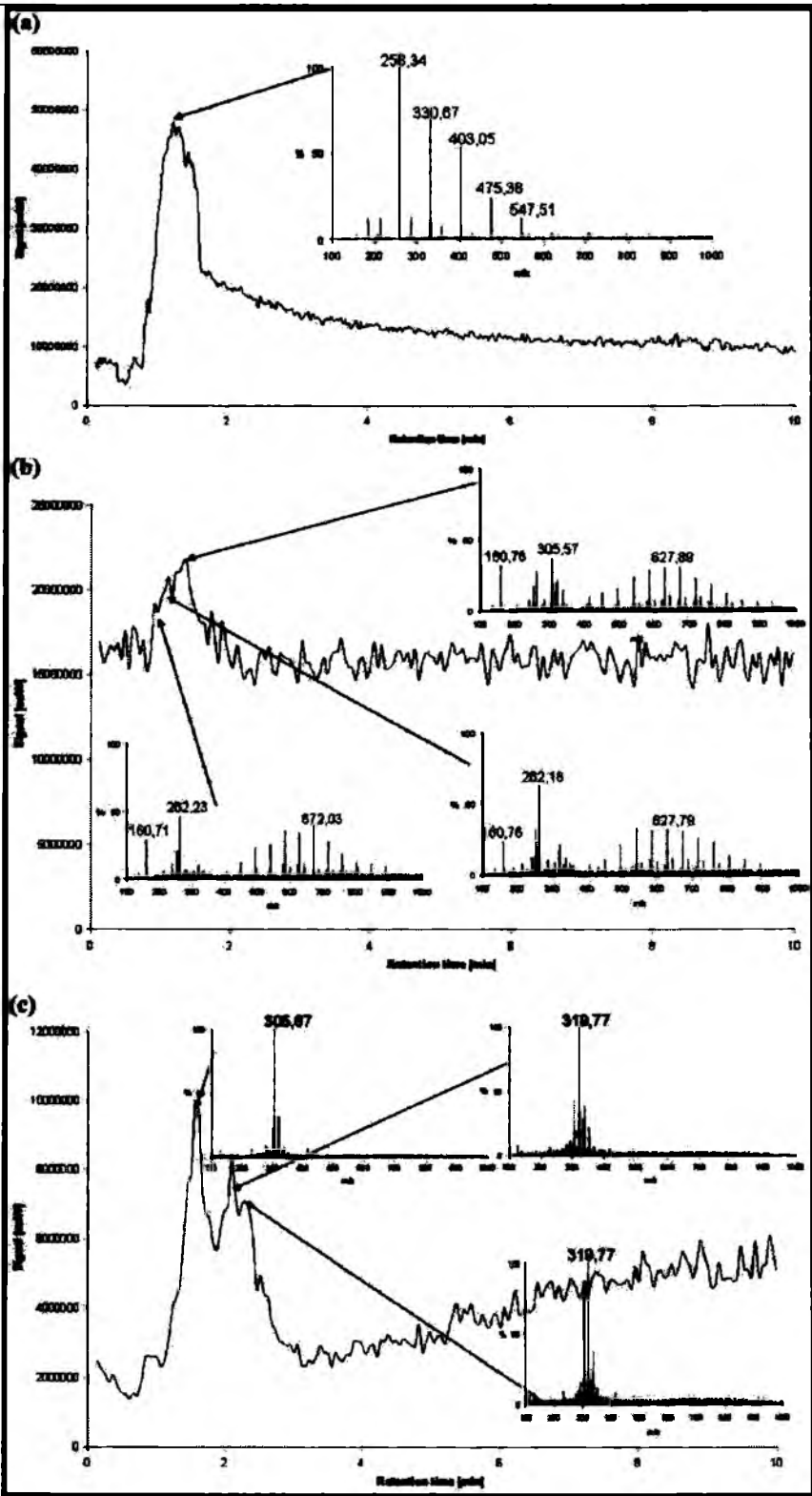


Figure 8. Continued

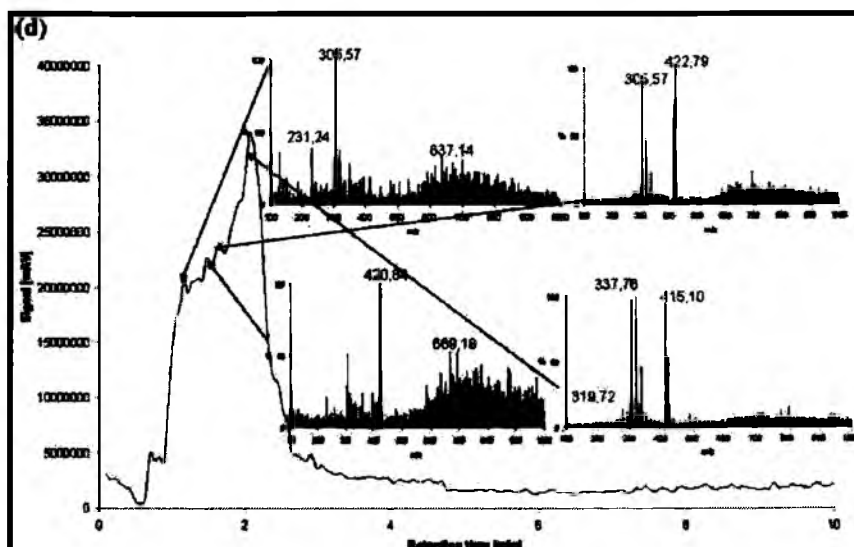


Figure 8. Chromatogram of an L-lactic acid solution registered with the LC-MS system after (a) 0 min and (b) 980 min in ACN and after (c) 0 min and (d) 400 min in 70% EtOH; $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Insets show mass spectra of the effluents collected at the maxima of the respective peaks.

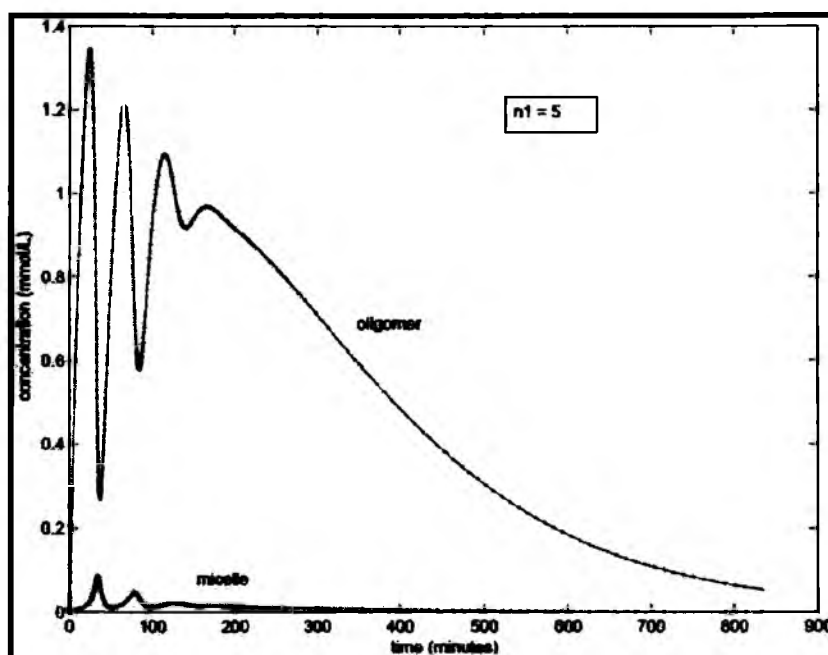


Figure 9. Simulated oscillations. Initial concentration of P = 0.02 M. Parameter values: $n_1 = 5$, $n_2 = 8$, $k_0 = 1.5 \times 10^{-5}\text{ s}^{-1}$; $k_u = 5 \times 10^{-5}\text{ s}^{-1}$; $k_s = 2.5 \times 10^{-5}\text{ M}^{-2}\text{ s}^{-1}$, $k_b = 5 \times 10^{-3}\text{ s}^{-1}$.

Our experiments, thus, demonstrate qualitatively the presence of oscillatory oligomerization of lactic acid. Our model simulations are similarly limited in that we have no data about the rate constants of individual steps nor about the identity of the oligomeric species. We must, therefore, be satisfied at this stage with a qualitative demonstration of the feasibility of oscillatory oligomerization, which our simulations provide. Further progress will require the development and application of techniques that make it possible to identify and monitor the individual components of this important system.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: epstein@brandeis.edu.

ACKNOWLEDGMENT

The work of D.K. and M.G. was partially supported by Ph.D. scholarships granted to them in 2009 within the framework of the University as a Partner of the Economy Based on Science (UPGOW) project, subsidized by the European Social Fund

(EFS) of the European Union. I.R.E. and M.D. thank the National Science Foundation (grant no. CHE-1012428) for support.

■ REFERENCES

- (1) Sajewicz, M.; Matlengiewicz, M.; Leda, M.; Gontarska, M.; Kronenbach, D.; Kowalska, T.; Epstein, I. R. *J. Phys. Org. Chem.* **2010**, *23*, 1066–1073.
- (2) Sajewicz, M.; Gontarska, M.; Kronenbach, D.; Berry, E.; Kowalska, T. *J. Chromatogr. Sci.* **2011** in press.
- (3) Sajewicz, M.; Gontarska, M.; Kronenbach, D.; Leda, M.; Kowalska, T.; Epstein, I. R. *J. Syst. Chem.* **2010**, *1* (7), 1–16.
- (4) Pellerin, L.; Bouzier-Sore, A.-K.; Aubert, A.; Serres, S.; Merle, M.; Costalat, R.; Magistretti, P. J. *GLIA* **2007**, *55*, 1251–1262.
- (5) Ding, S.; Tan, T. *Process Biochem.* **2006**, *41*, 1451–1454.
- (6) Sajewicz, M.; Gontarska, M.; Kronenbach, D.; Kowalska, T. *Acta Chromatogr.* **2008**, *20*, 209–225.
- (7) Sajewicz, M.; John, E.; Kronenbach, D.; Gontarska, M.; Kowalska, T. *Acta Chromatogr.* **2008**, *20*, 367–382.
- (8) Duprat, F.; Coyard, V. *Chromatographia* **1992**, *34*, 31–34.
- (9) Hadik, P.; Kotsis, L.; Eniszné-Bódogh, M.; Szabó, L.-P.; Nagy, E. *Sep. Purif. Technol.* **2005**, *41*, 299–304.
- (10) Cecchi, L.; Malaspina, P. *Anal. Biochem.* **1991**, *192*, 219–221.
- (11) Belanger, P.; Atkinson, J. G.; Stuart, R. S. *J. Chem. Soc. D: Chem. Commun.* **1969**, 1067–1068.
- (12) Xie, Y.; Liu, H.; Chen, J. *Int. J. Pharm.* **2000**, *196*, 21–26.
- (13) Becker, R.; Döring, W. *Ann. Phys.* **1935**, *24*, 719–752.
- (14) Coveney, P. V.; Wattis, J. A. D. *Mol. Phys.* **2006**, *104*, 177–185.
- (15) Merkin, J. H.; Needham, D. J.; Scott, S. K. *Proc. R. Soc. London A* **1986**, *406*, 299–323.